

MESOSCALE DEVICES FOR ANALYSIS OF MOTILE CELLS**Patent number:** ES2169770T**Publication date:** 2002-07-16**Inventor:** WILDING PETER (US); KRICKA LARRY J (US)**Applicant:** TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF**Classification:****- International:** C12Q1/68; B01L3/00; B01L7/00**- european:** B01D61/18; B01D67/00H10D; B01D71/02; B01J19/00R;
B01L3/00C6M; C12M1/34; C12Q1/68D**Application number:** ES19950941393T 19951113**Priority number(s):** US19940338728 19941114; US19940338380 19941114;
US19940338369 19941114**Also published as:**

WO9615269 (A3)

WO9615269 (A2)

WO9614934 (A1)

WO9614933 (A1)

EP0739423 (A3)

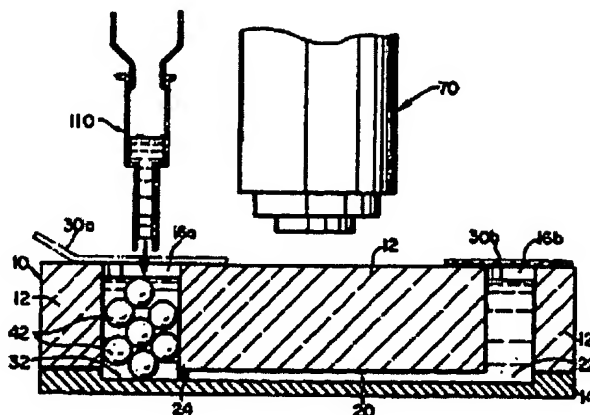
more >>

Report a data error here

Abstract not available for ES2169770T

Abstract of corresponding document: **WO9614933**

Devices and methods are provided to facilitate the rapid, accurate analysis of a sample having cells characterized by their motility. The devices comprise a solid substrate microfabricated to define a flow system including one or more ports or chambers. In one embodiment, the devices are provided for conducting replicate motile cell assays, or for conducting a series of different assays using a single test sample. In another embodiment, preparative devices are provided for separating and collecting selected motile cell types of interest. In another embodiment, a device designed for performing an in vitro fertilization is provided in a portable incubator, which maintains the in vitro fertilization under optimum conditions.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 169 770**

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

B01L 3/00

B01L 7/00

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **95941393.1**

⑧⑥ Fecha de presentación: **13.11.1995**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 739 423**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.1996**

⑤④ Título: **Dispositivos mesoescalares de amplificación de polinucleótidos.**

③⑩ Prioridad: **14.11.1994 US 338728**
14.11.1994 US 338380
14.11.1994 US 338369

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.07.2002

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.07.2002

⑦③ Titular/es: **THE TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA**
Center for Technology Transfer
3700, Market Street, Suite 300
Philadelphia, Pennsylvania 19104-3147, US

⑦② Inventor/es: **Wilding, Peter y
Kricka, Larry J.**

⑦④ Agente: **Cobas Horcajo, Susana**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Dispositivos mesoescalares de amplificación de polinucleótidos.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere en general a procedimientos y aparatos para realizar la amplificación y análisis varios de polinucleótidos. Más particularmente, la invención se refiere al diseño y construcción de módulos pequeños, típicamente de un único uso para uso en análisis que implican reacciones de amplificación de polinucleótidos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En las últimas décadas, la técnica ha desarrollado un gran número de protocolos, equipos de pruebas, y cartuchos para realizar análisis de muestras biológicas para varios propósitos de diagnóstico y control. Los inmunoensayos, los ensayos inmunométricos, los ensayos de aglutinación y los análisis basados en ensayos de amplificación de polinucleótidos (tales como la reacción en cadena de la polimerasa) o en interacciones ligando-receptor varias y/o migración diferencial de especies en una muestra compleja, se han usado para determinar la presencia o concentración de contaminantes o compuestos biológicos varios, o la presencia de tipos de células particulares.

Recientemente, se han desarrollado dispositivos desechables, pequeños, para manejar muestras biológicas y para realizar ciertos ensayos clínicos. Shoji y col. presentaron el uso de un analizador de gases en sangre en miniatura fabricado en un disco de silicio. Shoji y col., *Sensors and Actuators*, 15:101-107 (1988). Sato y col. presentaron una técnica de fusión celular que usa dispositivos micromecánicos de silicio. Sato y col., *Sensors y Actuators*, A21-A23:948-953 (1990). Ciba Coming Diagnostics Corp. (USA) ha fabricado un fotómetro láser controlado por microprocesador para detectar la coagulación de la sangre.

La tecnología de micromáquinas, que usa, por ejemplo, sustratos de silicio, ha permitido la fabricación de dispositivos microdiseñados que tienen elementos estructurales con dimensiones mínimas que varían desde decenas de micrómetros (las dimensiones de las células biológicas) hasta nanómetros (las dimensiones de algunas macromoléculas biológicas). Angell y col., *Scientific American*, 248: 44-55 (1983). Wise y col., *Science*, 245:1335-42 (1991); y Kricka y col., *J.Int. Fed. Clin. Chem.*, 6:54-59 (1994). La mayoría de los experimentos que implican elementos estructurales de este tamaño se relacionan con la micromecánica, es decir, movimiento mecánico y propiedades de flujo. La capacidad potencial de estas estructuras no se ha explotado completamente en las ciencias de la vida.

Brunette (*Exper. Cell Res.*, 167:203-217 (1986) y 164:11-26 (1986)) estudió el comportamiento de fibroblastos y las células epiteliales en ranuras en silicio, polímeros revestidos de titanio, y otros por el estilo. McCartney y col. (*Cancer Res.*, 41:3046-3051 (1981)) examinó el comportamiento de células tumorales en sustratos plásticos ranurados. LaCelle (*Blood Cells*, 12:179-189 (1986)) estudió el flujo de leucocitos y eritrocitos en microcapilares para aprender sobre la microcirculación. Hung y Weissman presentaron un estudio de dinámica de fluidos en canales micromaquinados, pero no produjeron datos asociados con un dispositivo analítico. Hung y col., *Med. and Biol. Engineering*, 9:237-245 (1971); y Weissman y col., *Am. Inst. Chem. Eng. J.*, 17:25-30 (1971). Columbus y col. utilizaron un emparejado compuesto de dos láminas en relieve ranuradas en V orientadas ortogonalmente en el control del flujo capilar de fluidos biológicos hacia electrodos selectivos de iones discretos en un dispositivo de ensayo multicanal experimental. Columbus y col., *Clin. Chem.*, 33:1531-1537 (1987). Masuda y col. y Washizu y col. han presentado el uso de un lecho de flujo fluido para la manipulación de células (por ejemplo, fusión celular). Masuda y col. *Proceedings IEEE/IAS Meeting*, pp. 1549-1553 (1987); y Washizu y col., *Proceedings IEEE/IAS Meeting*, pp. 1735-1740 (1988). Se han utilizado sustratos de silicio para desarrollar microdispositivos para la medición del pH y biodetectores. McConnell y col., *Science*, 257:1906-12 (1992); y Erickson y col., *Clin. Chem.*, 39:283-7 (1993). No obstante, el potencial de usar tales dispositivos para el análisis de fluidos biológicos ha permanecido hasta ahora en gran parte inexplorado.

Las metodologías para utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un segmento de ADN están bien establecidas. (Ver, por ejemplo, Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 14.1-14.35.) Una reacción de amplificación por PCR se puede realizar en un molde de ADN utilizando una ADN polimerasa termoestable, por ejemplo, ADN polimerasa Taq (Chien y col. *J. Bacteriol.*, 127:1550 (1976)), nucleósidos trifosfato, y dos oligonucleótidos con secuencias diferentes, complementarias a las secuencias que se encuentran en las cadenas opuestas del molde de ADN y que flanquean al segmento de ADN que se ha de amplificar ("cebadores"). Los componentes de la reacción se ciclan entre una temperatura alta (por ejemplo,

94°C) para deshibridar ("desnaturalizar") el molde de ADN de doble cadena, seguido de temperaturas más bajas (por ejemplo, 40-60°C para el anillamiento de los cebadores y, por ejemplo, 70-75°C para la polimerización). Un ciclo de reacción repetido entre las temperaturas de deshibridación, anillamiento y polimerización proporciona aproximadamente una amplificación exponencial del molde de ADN. Por ejemplo, se puede obtener hasta 1 µg del ADN blanco de hasta 2 kb de longitud a partir de 30-35 ciclos de amplificación con sólo 10⁻⁶ µg de ADN de partida. Se dispone de máquinas para realizar reacciones en cadena por PCR automatizadas utilizando un ciclador térmico (Perkin Elmer Corp.)

La amplificación de polinucleótidos se ha aplicado al diagnóstico de trastornos genéticos (Engelke y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:544 (1988), la detección de secuencias de ácidos nucleicos de organismos patógenos en muestras clínicas (Ou y col., *Science*, 239:295 (1988)), la identificación genética de muestras forenses, por ejemplo, esperma (Li y col., *Nature*, 335:414 (1988)), el análisis de mutaciones en oncogenes activados (Farr y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:1629 (1988)) y en muchos aspectos de la clonación molecular (Oste, *BioTechniques*, 6:162 (1988)). Los ensayos de amplificación de polinucleótidos se pueden usar en un amplio intervalo de aplicaciones tales como la generación de secuencias específicas de ADN de doble cadena clonado para uso como sondas, la generación de sondas específicas para genes no clonados por amplificación selectiva de segmentos particulares de cADN, la generación de bibliotecas de cADN a partir de pequeñas cantidades de mRNA, la generación de grandes cantidades de ADN para secuenciar, y el análisis de mutaciones.

Se han descrito en la técnica una amplia variedad de dispositivos y sistemas para realizar reacciones de amplificación de polinucleótidos utilizando procedimientos de variación cíclica de la temperatura. Templeton, *Diag. Mol. Path.*, 1:58-72 (1993); Lizardi y col., *Biotechnology*, 6:1197-1202 (1988); Backman y col., Patente Eur. No. 320308 (1989); y Panaccio y col., *BioTechniques*, 14:238-43 (1993). Los dispositivos usan una amplia variedad de principios de diseño para la transferencia, tales como baños de agua, baños de aire y bloques secos tales como el aluminio. Haff y col., *BioTechniques*, 10:102-12 (1991); Findlay y col., *Clin. Chem.*, 39:1927-33 (1993); Wittwer y col., *Nucl. Acids Res.*, 17:4353-7 (1989). Se han descrito las reacciones PCR en volúmenes de reacción pequeños. Wittwer y col., *Anal. Biochem.*, 186:328-31 (1990); y Witter y col., *Clin. Chem.*, 39:804-9 (1993). Se han descrito también microdispositivos para amplificación de polinucleótidos fabricados de silicio. Northrup y col., En: *Digest of Technical Papers: Transducers 1993* (Proc. 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators) Instituto de Ingenieros Eléctricos y Electrónicos, Nueva York, NY, pp. 924-6; y Northrup y col., PCTWO94/05414 (1994).

Las partículas de sílice han mostrado ligarse a los ácidos nucleicos, y se han usado para aislar ácidos nucleicos antes del análisis por PCR. Zeillinger y col., *BioTechniques*, 14:202-3(1993). Mientras que la técnica ha descrito el uso del silicio y otros sustratos fabricados con microcanales y cámaras para usos en una variedad de análisis, se ha centrado poca atención en los procedimientos para la modificación de silicio micromaquinado u otras superficies, para disminuir la ligación y otras propiedades de las superficies, las cuales pueden inhibir reacciones, tales como las reacciones de amplificación de polinucleótidos, realizadas en los dispositivos. Northrup y col. describen la silanización química de una cámara de reacción PCR en un sustrato de silicio que tiene una profundidad de 0,5 mm. Northrup y col., En: *Digest of Technical Papers: Transducers 1993* (Proc. 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators) Instituto de Ingenieros Eléctricos y Electrónicos, Nueva York, NY, pp. 924-6; y Northrup y col., PCTWO94/05414 (1994). La referencia de Northrup y col., (En: *Digest of Technical Papers: Transducers 1993*), no obstante, describe que, en ausencia de silanización, las superficies de silicio no tratadas de las cámaras de reacción no han tenido efecto inhibitorio en la reacción por PCR.

Se necesitan sistemas convenientes, rápidos, para análisis de amplificación de polinucleótidos, los cuales podrían usarse clínicamente en un amplio intervalo de aplicaciones potenciales en ensayos clínicos tales como pruebas de paternidad, y enfermedades genéticas e infecciosas y una amplia variedad de otros ensayos en las ciencias de la vida y medioambientales. Es necesario el desarrollo de microdispositivos fabricados en sustratos tales como el silicio las cuales permitan realizar las reacciones de amplificación de polinucleótidos con altos rendimientos sin efectos interferentes en la reacción causados por las superficies del sustrato.

Un objeto de la invención es proporcionar dispositivos analíticos a microescala con ambientes de reacción óptimos para realizar reacciones de amplificación de polinucleótidos las cuales se pueden usar para detectar concentraciones muy bajas de un polinucleótido y para producir resultados analíticos rápidamente. Otro objeto es proporcionar fácilmente dispositivos producidos en masa, desechables, pequeños (por ejemplo, menores que alrededor de 1 cc de volumen) que tengan elementos funcionales capaces

de análisis de amplificación de polinucleótidos rápidos, automatizados, de una muestra de células o libre de células preseleccionada, en una gama de aplicaciones. Es otro objeto de la invención proporcionar agentes para el uso en cámaras de reacción a microescala fabricados en sustratos sólidos tales como el silicio, para disminuir los potenciales efectos inhibitorios de las superficies del sustrato en una reacción de amplificación de polinucleótidos. Es otro objeto de la invención proporcionar aparatos para enviar reactivos y fluidos de muestra hasta y desde las cámaras microescalares de amplificación de polinucleótidos fabricadas en sustratos sólidos tales como el silicio, y proporcionar aparatos para sellar la cámara de reacción durante una reacción de amplificación. Es aún otro objeto de la invención proporcionar aparatos que se puedan usar para ejecutar una gama de ensayos clínicos rápidos, por ejemplo, ensayos para infección bacteriana o viral, ensayos para contaminantes de cultivos celulares, o ensayos para la presencia de ADN recombinante o de un gen en una célula, y otros por el estilo.

Estos y otros objetos y características de la invención serán claros a partir de la descripción, dibujos y reivindicaciones que siguen.

Resumen de la invención

La invención proporciona una familia de dispositivos pequeños, producidos en masa, típicamente de un solo uso (algunas veces referidos aquí como "placas") para realizar una reacción para permitir la rápida amplificación de un polinucleótido en una muestra. En una realización, el dispositivo consta de un sustrato sólido que se fabrica para constar de una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos mesoescalar. El dispositivo también puede incluir una cubierta, por ejemplo, una cubierta transparente, dispuesta sobre el sustrato, para sellar al menos una porción de la cámara de reacción durante una reacción de amplificación. El dispositivo incluye además al menos un puerto en comunicación fluida con la cámara de reacción, para introducir una muestra en la cámara (algunas veces referido aquí como "puerto de entrada de muestras" o "puerto de entrada"). El dispositivo puede incluir uno o más canales de flujo extendiéndose desde los puertos hasta la cámara de reacción, y/o conectando dos o más cámaras de reacción. El dispositivo puede también incluir uno o más puertos adicionales en comunicación fluida con la cámara de reacción, para servir como puertos de acceso, puertos de entrada/salida y/o respiradero. Se pueden fabricar uno o más puertos y/o canales de flujo del dispositivo en la cubierta o en el sustrato. En el dispositivo, se le puede proporcionar a la cámara de reacción un material el cual disminuya la inhibición de la reacción de amplificación de polinucleótidos por la(las) pared(es) que definen la cámara de reacción. El dispositivo también puede incluir medios para ciclar térmicamente los contenidos de la cámara para permitir la amplificación de un polinucleótido de muestra.

El término "mesoescala" se usa aquí con referencia a cámaras de reacción o canales de flujo, teniendo al menos uno de los mismos una dimensión transversal entre $0,1\ \mu\text{m}$ y $1.000\ \mu\text{m}$. Los canales de flujo dirigidos a la cámara de reacción tienen anchuras y profundidades preferidas del orden de alrededor de $2,0$ a $500\ \mu\text{m}$. Las cámaras en el sustrato en el cual tiene lugar la amplificación pueden tener una o más dimensiones mayores, por ejemplo, anchuras y/o longitudes de alrededor de 1 a $20\ \text{mm}$. Las anchuras y longitudes preferidas de las cámaras de reacción están en el orden de alrededor de 5 a $15\ \text{mm}$. Las cámaras de reacción se fabrican con profundidades en el orden de alrededor de $0,1$ hasta como mucho alrededor de $1.000\ \mu\text{m}$. Típicamente, las cámaras de reacción se fabrican con profundidades menores que $500\ \mu\text{m}$, por ejemplo, menores que alrededor de $300\ \mu\text{m}$, y opcionalmente menores que alrededor de $80\ \mu\text{m}$. La fabricación de la cámara de reacción, con profundidades pequeñas, por ejemplo, menores que $300\ \mu\text{m}$, facilitan ventajosamente la transmisión de calor a los contenidos de la cámara de reacción, por ejemplo, mediante el sustrato, y permiten una eficiente variación cíclica de temperatura durante una reacción de amplificación que requiera una variación cíclica de temperatura. No obstante, en algunas realizaciones, las cámaras de reacción se pueden fabricar con profundidades entre alrededor de $500\ \mu\text{m}$ y $1.000\ \mu\text{m}$. El tamaño total del dispositivo varía desde micrómetros hasta unos pocos milímetros de espesor, dependiendo del material del cual se construye, y aproximadamente $0,2$ a $5,0$ centímetros de longitud o anchura.

Los dispositivos se pueden usar para amplificar y/o analizar microvolúmenes de una muestra, introducida en el sistema de flujo mediante un puerto de entrada definido, por ejemplo, por un agujero comunicante a través del sustrato o la cubierta. El volumen del sistema de flujo mesoescalar será típicamente menor que $50\ \mu\text{l}$, y el volumen de las cámaras de reacción es frecuentemente menor que $20\ \mu\text{l}$, por ejemplo, $10\ \mu\text{l}$ o menos. El volumen de las cámaras y canales individuales en otra realización puede ser menor que $1\ \mu\text{l}$, por ejemplo, en el intervalo de los nanolitros o picolitros. Los polinucleótidos presentes en muy bajas concentraciones, (por ejemplo, en cantidades de nanogramos) pueden amplificarse y detectarse rápidamente (por ejemplo, en menos de diez minutos). Después de que se completa un ensayo de

amplificación de polinucleótidos, los dispositivos se pueden desechar o se pueden limpiar y reutilizar.

En una realización, se pueden fabricar cámaras de reacción en donde la relación entre el área superficial de las paredes que definen la cámara de reacción y el volumen de la cámara de reacción es mayor que
 5 alrededor de $3 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$. Las cámaras también se pueden fabricar con relaciones área superficial / volumen incluso mayores, tales como $5 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ u, opcionalmente, mayores que $10 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$. Según aumenta la relación entre el área superficial y el volumen, se facilita la transferencia de calor a través del sustrato hacia y desde los contenidos de la cámara de reacción, y de esta forma la variación cíclica de temperatura de la reacción se hace más eficiente, y se incrementa la productividad de la reacción. Adicionalmente,
 10 sin embargo, según la relación entre el área superficial y el volumen aumenta, aumentan los efectos de inhibición potenciales de las paredes del sustrato en la reacción de amplificación de los polinucleótidos. Dependiendo del material del que está hecho el dispositivo, las superficies de las paredes de las cámaras y los canales mesoescalares podrían interferir con la amplificación del polinucleótido, por ejemplo, por interacciones de ligación entre el material y los polinucleótidos de muestra o los reactivos de amplificación.

La invención proporciona una gama de materiales los cuales se pueden proporcionar en la cámara de reacción para disminuir los efectos inhibitorios potenciales de las superficies de las paredes de la cámara de reacción, tales como superficies de silicio, en la reacción. Las composiciones son particularmente útiles en
 20 cámaras de reacción que tienen una relación área superficial / volumen mayor que alrededor de $3 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ ó $5 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$, o, en otra realización, en cámaras en donde la relación excede de alrededor de $10 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$. El dispositivo también puede incluir una cubierta dispuesta sobre la cámara de reacción para sellar la cámara de reacción durante una reacción de amplificación. La cubierta puede constar de un material tal como el vidrio o el silicio, o un material plástico. El uso de una cubierta dispuesta sobre la cámara de reacción incrementa la cantidad total de área superficial en contacto con fluido en la cámara de reacción.
 25 La superficie de la cubierta expuesta a la cámara de reacción también se puede tratar con materiales como los descritos aquí para reducir los efectos inhibitorios potenciales del material de la superficie de la cubierta en la reacción de amplificación.

Se puede adherir covalente o no covalentemente a la superficie de la pared de la cámara de reacción un material proporcionado a la cámara de reacción para disminuir la inhibición de una reacción de amplificación por una pared de la cámara de reacción, o puede proporcionarse en disolución en la cámara de reacción durante una reacción de amplificación. En una realización, las superficies de las paredes de una o más cámara(s) de reacción y/o canal(es) en el dispositivo se pueden revestir con un silano, utilizando
 30 un reactivo de silanización tal como el dimetilclorosilano, dimetildiclorosilano, hexametildisilazano o trimetilclorosilano (disponibles, por ejemplo, de Pierce, Rockford, IL). Alternativamente, a la superficie de las paredes de la(s) cámara(s) de reacción y/o del (los) canal(es) de flujo, por ejemplo, fabricados dentro de un sustrato de silicio, se les puede proporcionar un revestimiento relativamente inerte, por ejemplo, usando un reactivo siliconizante, tal como AquasilTM o SurfasilTM (Pierce, Rockford, IL), o SigmacoteTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los reactivos siliconizantes disponibles de fabricantes comerciales, tales como Pierce (Rockford, IL) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), son organosilanos que contienen un grupo hidrolizable, el cual se puede hidrolizar en disolución para formar un silanol el cual puede polimerizar y formar una película sobre la superficie de la cámara, y puede reaccionar con grupos hidroxilo en la superficie de la cámara, de tal forma que la película está estrechamente unida sobre toda la superficie.
 40 El revestimiento puede incluir además una macromolécula (algunas veces referida aquí como "agente de bloqueo") asociado no covalentemente o covalentemente con el revestimiento de silicona, para reducir más los efectos inhibitorios de la pared de la cámara de reacción en la reacción de amplificación. Las macromoléculas útiles incluyen un polímero de aminoácidos, o polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido poliadenílico o polimaleimida.

Se puede proporcionar una película de óxido de silicio en la superficie de la cámara de reacción y/o las paredes de los canales, en un sustrato de silicio, para reducir la inhibición de la reacción de amplificación por las superficies de las paredes. La película de óxido de silicio se puede formar por un procedimiento térmico en donde el sustrato de silicio se calienta en presencia de oxígeno. Alternativamente, se puede
 50 utilizar un procedimiento de oxidación mejorada por plasma, o un depósito químico en fase vapor mejorado por plasma. Adicionalmente se puede revestir la cámara de reacción y/o las paredes de los canales con un polímero relativamente inerte tal como un poli (cloruro de vinilo).

Antes de la adición del polinucleótido de muestra y de los reactivos de amplificación a la cámara de reacción, se puede añadir a la cámara otro polinucleótido (algunas veces referido aquí como un polinucleótido "de bloqueo") tal como ADN genómico o ácido poliadenílico, preferiblemente a una concentración mayor que la concentración del polinucleótido de muestra. Esto permite al polinucleótido de bloqueo ocu-
 60

par cualquier sitio en las superficies de las paredes que pudiera unirse potencialmente al polinucleótido de muestra y reducir el rendimiento de la reacción o la precisión del ensayo. Así pues, en una realización, se puede proporcionar un polinucleótido de bloqueo a una cámara de reacción fabricada dentro de un sustrato de silicio, de tal modo que el polinucleótido de bloqueo pueda ocupar cualquier sitio de unión al polinucleótido, tales como grupos hidroxilo libres, en las superficies de las paredes de la cámara de reacción. Para evitar interferir con la reacción de amplificación, el polinucleótido de bloqueo debería constar de secuencias no relacionadas con la del polinucleótido de muestra. Otros materiales que se unen a las superficies de las paredes de la cámara, tales como ácido poliguanílico o polipéptidos varios tales como la caseína o la seroalbúmina, también se podrían utilizar como agentes de bloqueo.

10

Los dispositivos se pueden utilizar para llevar a cabo una reacción de amplificación de polinucleótidos, tal como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cámara de reacción. Se le pueden proporcionar a la cámara de reacción reactivos para PCR que incluyen un polinucleótido de muestra, polimerasa, nucleósidos trifosfato, un primer cebador capaz de hibridar con el polinucleótido de muestra, y un segundo cebador capaz de hibridar con una secuencia que es complementaria al polinucleótido de muestra, en donde el primer y segundo cebador definen los extremos del polinucleótido amplificado producto. El dispositivo también puede incluir medios para variar de forma cíclica la temperatura los contenidos de la cámara de reacción de amplificación, de tal forma que, en cada ciclo, por ejemplo, la temperatura se controla para 1) deshibridar ("desnaturalizar") el polinucleótido de doble cadena, 2) anillar los cebadores al polinucleótido de cadena simple, y 3) sintetizar el polinucleótido amplificado entre los cebadores. Se pueden utilizar también otros procedimientos de amplificación disponibles en la técnica, que incluyen, pero no están limitados a: (1) procedimientos de amplificación de polinucleótido blanco tales como la replicación automantenida de secuencias (3SR) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); (2) procedimientos basados en la amplificación de una señal unida al ADN blanco, tal como la amplificación de ADN por "cadena ramificada" (Chiron Corp.); (3) procedimientos basados en la amplificación de una sonda de ADN, tal como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación por la replicasa QB (QBR); y (4) otros procedimientos varios tales como la transcripción activada por ligación (LAT), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la reacción de reparación en cadena (RCR) y la reacción de la sonda cíclica (CPR) (para un análisis de estos procedimientos, ver pp. 2-7 de *The Genesis Report*, DX, Vol. 3, No. 4, Feb. 1994; Genesis Group, Montclair, N.J.).

30

La cámara de reacción se puede fabricar con una sección a la cual se le varía cíclicamente la temperatura secuencialmente entre las temperaturas requeridas para las reacciones de amplificación de polinucleótidos que requieren variación cíclica de la temperatura, tales como la PCR convencional. Alternativamente, la cámara de reacción puede constar de dos o más secciones, fijadas a las diferentes temperaturas requeridas para la deshibridación, anillamiento y polimerización, caso en el cual el dispositivo consta además de medios para transferir los contenidos de la cámara entre las secciones para llevar a cabo la reacción, por ejemplo, una bomba controlada por ordenador. La cámara de reacción se puede limitar en al menos una porción de la cámara por una cubierta dispuesta sobre el sustrato. El dispositivo puede incluir además medios para detectar el polinucleótido amplificados, como se describe aquí. Los dispositivos pueden usarse para llevar a cabo una variedad de análisis de polinucleótidos automatizados, sensibles y rápidos, incluyendo análisis de presencia de polinucleótidos en células o en disolución, o para análisis de virus o tipos celulares usando la presencia de un polinucleótido particular como marcador.

40

El (los) canal(es) de flujo mesoescalar y la(s) cámara(s) de reacción se pueden diseñar y fabricar a partir de sustratos sólidos usando procedimientos de micromaquinado establecidos tales como técnicas de fotolitografía, mordentado y técnicas de deposición, maquinado láser, tratamiento LIGA (Becker y col., *Microelec. Eng.* 4; 35-56, 1986) y moldeado plástico. Los sistemas de flujo mesoescalar en los dispositivos se pueden construir mediante la fabricación de canales de flujo y una o más cámaras de reacción en la superficie del sustrato, y adhiriendo o fijando entonces una cubierta sobre el sustrato. El sustrato sólido y/o la cubierta pueden constar de un material tal como el silicio, polisilicio, sílice, vidrio, arseniuro de galio, poliimida, nitruro de silicio y dióxido de silicio. La cubierta y/o el sustrato pueden constar alternativamente de un material plástico tal como un acrílico, policarbonato, poliestireno o polietileno. Opcionalmente la cubierta y/o el sustrato pueden constar de un material transparente.

55

Se puede proporcionar también un aparato, para usar con el dispositivo, el cual contenga un sitio de acoplamiento para contener al sustrato del dispositivo y que opcionalmente se acople uno o más puertos de entrada en el sustrato con una o más líneas de flujo en el aparato. Después de que una muestra de fluido biológico sospechosa de contener un polinucleótido particular se suministra al puerto de entrada, el sustrato se sitúa en el aparato y se accionan bombas, por ejemplo, dispuestas en el aparato, para forzar la muestra a través del sistema de flujo. Alternativamente, se puede inyectar una muestra en el sustrato

60

por el aparato (por ejemplo mediante una jeringuilla encajada al aparato), Los reactivos requeridos para el ensayo, tales como la enzima polimerasa, se pueden añadir (en forma líquida o seca) a la muestra de polinucleótido antes de la inyección en el sustrato. Alternativamente, se pueden inyectar en la cámara de reacción los reactivos necesarios para completar el ensayo desde un puerto de entrada separado, por ejemplo, por el aparato. Los reactivos y muestras fluidas también pueden entrar al sistema de flujo mesoescalar por acción de la capilaridad o por gravedad.

La invención también proporciona medios para sellar una o más de los puertos de entrada/salida de fluido en el dispositivo durante una reacción de amplificación. Esto evita ventajosamente la evaporación de líquidos durante la variación cíclica de temperatura y así mantiene las concentraciones de reacción preferidas durante la reacción de amplificación. En una realización, se proporciona un aparato que incluye medios para enviar fluido hasta y desde la cámara de reacción a través de un puerto en el dispositivo, y adaptado para ajustarse a y/o encajar en el puerto, el cual puede sellar reversiblemente el puerto después de la liberación de fluido a la cámara de reacción. Por ejemplo, el aparato de liberación de fluido puede constar de una jeringuilla o una pipeta. En una realización, el aparato de liberación de fluido puede constar de una pipeta que incluye una punta de pipeta provista de una apertura para transferir fluido entre la pipeta y el puerto. La punta de pipeta puede ser opcionalmente liberable de la pipeta, y puede ser desechable para evitar la contaminación entre muestras.

El dispositivo puede incluir un sustrato que consta de un material conductor del calor tal como el silicio, así como una cubierta dispuesta sobre el sustrato, la cual puede constar de un material transparente tal como vidrio o un plástico. El dispositivo también incluye la cámara de amplificación de polinucleótidos mesoescalar, fabricada dentro del sustrato o la cubierta. La cubierta puede incluir una cavidad para recibir y ajustarse a la pipeta usada para enviar las disoluciones de reactivos y de la muestra hasta y desde la cámara de reacción. El dispositivo puede incluir además un canal de flujo que comunica a través de sustrato y/o la cubierta entre la apertura de la punta de la pipeta y la cámara de reacción, cuando la pipeta se encaja dentro de la cavidad. La apertura puede posicionarse en la pared de la punta de la pipeta para permitir a la punta de la pipeta moverse entre una primera posición que permite la transferencia de fluido desde la punta a través de la apertura y el canal hasta la cámara de reacción, y una segunda posición para permitir a la apertura mirar hacia una pared de la cavidad, sellando de ese modo el canal de flujo y la cámara de reacción durante una reacción. Adicionalmente, se puede proporcionar un miembro depresible el cual se extiende desde el sustrato y puede sellar el puerto por depresión del miembro contra el puerto.

La temperatura de una o más sección(es) en la cámara de reacción puede regularse, por ejemplo, proporcionando uno o más calentadores de resistencia eléctrica en el sustrato cerca de la cámara de reacción, o usando un láser pulsado u otra fuente de energía electromagnética dirigida a la cámara de reacción. El aparato puede incluir contactos eléctricos en la región de acoplamiento los cuales encajan con los contactos integrados en la estructura del sustrato, por ejemplo, para alimentar el calentamiento por resistencia eléctrica a la cámara de reacción. Se puede proporcionar también un elemento de enfriamiento en el aparato, para ayudar a la regulación térmica de la cámara de reacción. Se le puede proporcionar al aparato circuitería convencional en comunicación con detectores en el dispositivo para regular térmicamente los ciclos de temperatura requeridos para la deshibridación las reacciones de polimerización.

El polinucleótido amplificado producido por la reacción de amplificación de polinucleótidos en la cámara de reacción mesoescalar se puede recoger a través de un puerto en el sustrato y detectar. Alternativamente, se pueden emplear los procedimientos y reactivos específicos conocidos en la técnica para detectar directamente los productos de amplificación en la cámara de reacción (equipo y reactivos de PCR "Taq Man"TM, disponibles de Perkin Elmer Corp., por ejemplo). Como otra alternativa, se puede microfabricar en el sustrato una región de detección mesoescalar, en comunicación fluida con la cámara de reacción en el dispositivo, como parte del sistema de flujo mesoescalar. La región de detección puede incluir un componente aglutinante marcado, tal como un polinucleótido marcado o una sonda de anticuerpos, capaz de unirse detectablemente con el polinucleótido amplificado. La presencia del polinucleótido amplificado producto en la región de detección se puede detectar, por ejemplo, por detección óptica de la aglutinación del polinucleótido polimerizado y el componente aglutinante a través de una cubierta de vidrio sobre la región de detección o a través de una sección transparente o translúcida del sustrato mismo. Alternativamente, la región de detección puede constar de una serie de canales o perforaciones microlitográficas para separar por electroforesis y detectar un polinucleótido amplificado.

Un ensayo positivo también puede indicarse por cambios detectables en las propiedades de flujo del fluido de muestra, tales como cambios en la presión o la conductividad eléctrica en diferentes puntos en

el sistema de flujo durante la producción de polinucleótido amplificado en la cámara de reacción. En una realización, el dispositivo consta de un sistema de flujo mesoescalar el cual incluye una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos, y una región de detección (por ejemplo, una cámara o una porción del canal de flujo), usada en combinación con un aparato el cual incluye un equipamiento de detección tal como un espectrofotómetro capaz de leer un resultado positivo a través de una ventana óptica, por ejemplo, dispuesta sobre la región de detección. El aparato también puede diseñarse para recibir señales eléctricas indicativas de una lectura de presión, conductividad u otras por el estilo, detectadas en la cámara de reacción, la región de detección o alguna otra región del sistema de flujo.

- 10 El sustrato puede constar de una pluralidad de cámaras de reacción y/o detección para permitir la rápida amplificación paralela y/o detección de varios polinucleótidos en una mezcla. El sistema de flujo mesoescalar puede incluir protrusiones, o una sección de área transversal reducida, para causar la lisis de las células en la micromuestra antes de la liberación a la cámara de reacción. Se pueden usar como medio de lisis piezas de silicio con ángulos afilados, atrapadas en el camino de flujo. El sistema de flujo
- 15 mesoescalar puede también incluir una región de captura de células que consta de un componente aglutinante, por ejemplo, inmovilizado en la pared de un canal de flujo, el cual aglutina un tipo particular de células en una población celular heterogénea a una velocidad de flujo del fluido relativamente pequeña, y a una mayor velocidad de flujo o cambiando la naturaleza del disolvente, por ejemplo, libera el tipo de células antes de la liberación de las células hasta una región de lisis celular, y después a una cámara de
- 20 reacción. En esta realización, se aísla ARN o ADN intracelular de una subpoblación celular seleccionada y se envían a la cámara de reacción mesoescalar para análisis del polinucleótido en un aparato. En una realización alternativa, el reactivo aglutinante puede inmovilizarse en una partícula sólida, tal como una perla magnética o de látex, como se describe debajo.
- 25 Se pueden proporcionar dentro del sistema de flujo mesoescalar agentes formadores de complejos, tales como perlas magnéticas revestidas con una sonda de polinucleótido, las cuales se pueden mover a lo largo del sistema de flujo mediante un campo magnético externo, por ejemplo, en el aparato. La sonda de polinucleótido inmovilizada en las perlas magnéticas permite a las perlas unirse a un polinucleótido amplificado en la cámara de reacción o en una cámara de detección separada. Las perlas magnéticas que
- 30 contienen una sonda de polinucleótido inmovilizada se pueden, por ejemplo, llevar a través del sistema de flujo o introducirse de otra manera en la cámara de reacción al final de un ensayo para unirse al polinucleótido amplificado producto. El polinucleótido unido se puede entonces transportar en las perlas magnéticas hasta una cámara de detección o purificación en el sistema de flujo, o a un puerto de recogida. Alternativamente, las perlas magnéticas se pueden retener en una localización predeterminada en
- 35 el dispositivo, y transportarse entonces a una cámara de detección o de purificación después de unirse al polinucleótido producto.

Algunas de las características y beneficios de los dispositivos se ilustran en la Tabla 1. Los dispositivos pueden proporcionar un ensayo rápido para la detección de virus o bacterias patógenas, o para la presencia de ciertos tipos celulares, o para la presencia de un gen o una secuencia de ADN recombinante en una

40 célula. Los dispositivos como los descritos aquí se caracterizan todos por un sistema de flujo mesoescalar que incluye una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos, que tenga preferiblemente al menos una dimensión mesoescalar, la cual se usa para amplificar un polinucleótido en una muestra, y a la cual se le pueden proporcionar los reactivos de amplificación requeridos. El dispositivo se puede usar para amplificar un polinucleótido en una amplia gama de aplicaciones. A la conclusión del ensayo el dispositivo se puede desechar, o se puede limpiar y reutilizar.

50

55

60

TABLA 1

Característica	Beneficio
Flexibilidad	Sin límites al número de diseños o aplicaciones del dispositivo disponibles
Reproducible	Permite la producción fiable, estandarizada y en masa de los dispositivos
Bajo Coste de Producción	Permite precios competitivos con los sistemas existentes. Naturaleza desechable de los procedimientos de uso único.
Pequeño Tamaño	No se requiere instrumentación voluminosa. Se presta a unidades portátiles y sistemas diseñados para el uso en ambientes de laboratorio no convencionales. Costes mínimos de transporte y almacenamiento.
Microescala	Se requieren volúmenes de muestra y reactivo mínimos. Reduce los costes de reactivos, especialmente para los procedimientos de ensayo más caros y especializados. Permite esquemas de instrumentación simplificados.
Esterilidad	Los dispositivos pueden esterilizarse para su uso en ensayos microbiológicos y otros procedimientos que requieren ambientes limpios
Sistema Sellado	Minimiza los riesgos biológicos. Asegura la integridad del procedimiento.
Capacidades de Circuito Múltiples	Puede realizar múltiples procedimientos o análisis en un único dispositivo. Permite ensayos panel.
Capacidades Múltiples y Detectoras	Expande las capacidades para el seguimiento de procedimientos de ensayo a virtualmente cualquier sistema. Permite una extensa gama de aplicaciones.
Dispositivos Reutilizables	Reduce los costes por procedimiento para el usuario para ciertas aplicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una vista transversal longitudinal esquemática de un dispositivo 10 según la invención que incluye un sustrato sólido 14, en el cual está maquinado el canal de flujo mesoescalar 20 conectado a los puertos de entrada 16 y la cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos 22, con una cubierta 12 adherida a la superficie del sustrato.

La Figura 1B es una vista transversal longitudinal esquemática de una realización alternativa del dispositivo 10 según la invención que incluye un sustrato sólido 14, en el cual está maquinada la cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos mesoescalar 22 y los puertos de entrada 16 con la cubierta 12 adherida a la superficie del sustrato.

La Figura 1C es una vista transversal longitudinal esquemática de otra realización del dispositivo 10 la cual incluye un sustrato sólido 14 fabricado con la cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos 22, y la cubierta 12 fabricada con los puertos 16 y los canales 20 en comunicación fluida con la cámara 22.

La Figura 2A es una vista en perspectiva del dispositivo de la Figura 1A.

La Figura 2B es una vista en perspectiva del dispositivo de la Figura 1B.

La Figura 3A es una ilustración esquemática de un dispositivo analítico 10 encajado dentro de un aparato ilustrado esquemáticamente 50, el cual se puede usar para soportar al dispositivo 10 y el cual incluye un elemento calefactor 57 para regular la temperatura de la cámara de reacción 22 en el dispositivo 10.

La Figura 3B es una ilustración esquemática de un dispositivo analítico 10 encajado dentro del aparato 50, el cual se puede usar para soportar al dispositivo 10 y el cual incluye el elemento calefactor 53 para regular la temperatura de la cámara de reacción 22 en el dispositivo 10.

5 La Figura 4 es una vista transversal longitudinal esquemática de un dispositivo según la invención que incluye un sustrato sólido 14, en el cual está maquinado el canal de flujo mesoescalar 20 conectado a los puertos de entrada 16 y a las secciones de la cámara de reacción de 22, con una cubierta 12 adherida a la superficie del sustrato.

10 La Figura 5 es una vista en perspectiva del dispositivo de la Fig. 4.

La Figura 6A es una ilustración esquemática del dispositivo analítico 10 encajado dentro del aparato 50, el cual se puede usar para soportar al dispositivo 10 y el cual incluye los elementos calefactores 57 para regular la temperatura de las secciones de la cámara de reacción 22 en el dispositivo 10.

15 La Figura 6B es una ilustración esquemática del dispositivo analítico 10 encajado dentro del aparato 50, el cual se puede usar para soportar al dispositivo 10 y el cual incluye elementos calefactores 57 para regular la temperatura de las secciones de la cámara de reacción 22A en el dispositivo 10.

20 La Figura 7 es una vista plana esquemática de un sustrato 14 microfabricado con las secciones de la cámara de reacción mesoescalar 22A y 22B, en comunicación fluida con una cámara de detección que consta de un sistema divergente de canales de flujo 40 de dimensión transversal progresivamente decreciente dispuesto en el sustrato.

25 La Figura 8 es una vista en perspectiva transversal de un canal de flujo 20 en el sustrato 14 con protrusiones de filtrado de células o desechos 80 que se extienden desde una pared del canal.

La Figura 9 es una vista en perspectiva transversal de un canal de flujo 20 en el sustrato 14 con protrusiones para la rotura de las células 80 que se extienden desde una pared del canal.

30 La Figura 10A es una vista plana esquemática de un dispositivo analítico mesoescalar que incluye las secciones de la cámara de reacción 22A y 22B, y la cámara de detección 22C, microfabricadas en el sustrato 14.

35 La Figura 10B es una vista plana esquemática de otro dispositivo analítico mesoescalar que incluye las secciones de la cámara de reacción 22A y 22B, y la región de detección 26, microfabricadas en el sustrato 14.

La Figura 11 es una vista plana esquemática de otro dispositivo analítico mesoescalar que incluye una 40 cámara de reacción 22A microfabricada en el sustrato 14.

La Figura 12 es una vista plana esquemática de un dispositivo analítico fabricado con una serie de cámaras mesoescalares adecuadas para llevar a cabo una variedad de funciones que incluyen separación celular, lisis celular y análisis de polinucleótidos.

45 La Figura 13 es una vista plana esquemática de un dispositivo analítico fabricado con dos sistemas de canales de flujo divididos 40.

50 Las Figuras 14, 15 y 16 ilustran vistas planas superiores de diferentes realizaciones de un filtro mesoescalar 24 microfabricado en el canal de flujo 20 en un dispositivo analítico 10.

La Figura 17 es una vista en perspectiva esquemática de un aparato 60 usado en combinación con el dispositivo 10 (no mostrado) para ver los contenidos del dispositivo 10.

55 La Figura 18 es una vista transversal esquemática del aparato 60 de la Figura 17.

La Figura 19 es una vista transversal esquemática de un dispositivo que incluye el sustrato 14 y la cubierta transparente 12 la cual incluye la cavidad 87 recibiendo a la pipeta 86.

60 La Figura 20 es una vista transversal esquemática de una punta de pipeta 84 que incluye la apertura 88.

La Figura 21 es una vista transversal esquemática de un sustrato 14 provisto del miembro 85 el cual puede comprimirse para sellar el puerto 16 y el canal 20.

La Figura 22 es una vista en perspectiva esquemática de un aparato que incluye una cubierta trans-
5 parente 12 provista de la cavidad 87 y el pasillo de flujo 20A que se dirige al canal de flujo 20B y la cámara de reacción 22 en el sustrato 14.

La Figura 23 es un dibujo que ilustra un patrón de un gel de electroforesis de agarosa de muestras de polinucleótidos amplificados en una cámara de amplificación mesoescalar.

10 Caracteres de referencia iguales en las figuras dibujadas respectivas indican partes correspondientes. Los dibujos no están necesariamente a escala.

Descripción detallada

15 A. General

La invención proporciona una familia de dispositivos pequeños, producidos en masa, típicamente de un solo uso, para realizar reacciones de amplificación de polinucleótidos para permitir la rápida amplificación
20 de polinucleótidos en muestras fluidas. El dispositivo consta de un sustrato sólido, fabricado para incluir al menos una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos, y tiene típicamente una longitud y/o anchura que varía desde aproximadamente 1,0 hasta 5,0 centímetros. Los canales y cámaras transversales a través del espesor del dispositivo pueden ser triangulares, cónicos truncados, cuadrados, rectangulares, circulares, o de cualquier otra forma. El dispositivo también incluye un puerto de entrada de muestra en
25 comunicación fluida con la cámara de reacción. El dispositivo también puede incluir puertos adicionales (los cuales pueden funcionar como puertos de acceso o entrada/salida, o como respiraderos) dispuestos en cualquier localización en el sistema de flujo, y uno o más canales de flujo de muestra, en comunicación fluida con la cámara de reacción. Uno o más de los puertos pueden estar abiertos a la atmósfera o unidos a dispositivos de presión o succión apropiados, por ejemplo, para llenar o evacuar el dispositivo, o pueden
30 estar sellados, por ejemplo, durante una reacción de amplificación. El(los) puerto(s) y el(los) canal(es) se pueden fabricar en el sustrato o, alternativamente, en una cubierta dispuesta sobre el sustrato, o ambos. El dispositivo puede además incluir un sistema para variar cíclicamente la temperatura de los contenidos de la cámara de reacción para permitir la amplificación de un polinucleótido de muestra.

35 Al menos una de las cámaras de reacción y los canales de flujo del dispositivo, y preferiblemente ambos, tienen una dimensión mesoescalar, es decir, al menos una dimensión transversal del orden de 0,1 a 1.000 μm . La profundidad preferida de la cámara de reacción es menor que alrededor de 500 μm , más preferiblemente menor que 300 μm y más preferiblemente menor que 80 μm . Las cámaras de reacción pueden tener anchuras y longitudes mayores, por ejemplo, del orden de alrededor de 1-20 mm, preferi-
40 blemente alrededor de 5-15 mm.

La poca profundidad de la cámara de reacción facilita ventajosamente la transmisión de calor a los contenidos de la cámara de reacción, por ejemplo, desde un calentador posicionado cerca del sustrato, y permite la eficaz variación cíclica de temperatura durante una reacción de amplificación. En una reali-
45 zación, la cámara de reacción se puede fabricar de forma tal que la relación entre el área superficial de las paredes de la cámara de reacción y el volumen de la cámara de reacción varía desde alrededor de 3 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$ hasta mayor que alrededor de 10 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$. Según aumenta la relación entre el área superficial y el volumen, se mejora la transmisión de calor a través del sustrato y la efectividad de la variación cíclica de temperatura de la reacción. No obstante, los efectos inhibitorios potenciales de las paredes del sus-
50 trato en la reacción de amplificación también se pueden incrementar, dependiendo del material del cual se construya el sustrato. De igual forma, se proporcionan materiales los cuales son útiles para disminuir los efectos inhibitorios de las superficies de las paredes, tales como superficies de silicio, en cámaras de reacción en las que tal tratamiento está garantizado.

55 Se pueden adherir covalente o no covalentemente materiales proporcionados para disminuir la inhibición de una reacción de amplificación por una pared de la cámara de reacción. Alternativamente, se pueden proporcionar un material en disolución en la cámara de reacción durante una reacción de amplificación. En una realización, el(los) canal(es) de flujo mesoescalar(es) y las cámaras de reacción se pueden fabricar en un sustrato de silicio. Las paredes de la(s) cámara(s) de reacción y/o el(los) canal(es)
60 se pueden revestir entonces con un material el cual reduce la inhibición de la reacción por las superficies de silicio en el dispositivo. Por ejemplo, las superficies de silicio del dispositivo se pueden revestir con cualquier gama de reactivos silanizantes disponibles en la técnica como se describe aquí.

En una realización, los dispositivos de la invención se pueden utilizar para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cámara de reacción. Se proporcionan a la cámara reactivos requeridos para una reacción en cadena de la polimerasa, que incluyen el polinucleótido de muestra, una polimerasa tal como la polimerasa Taq, nucleósidos trifosfato, un primer cebador hibridable con el polinucleótido de muestra, y un segundo cebador hibridable con una secuencia complementaria al polinucleótido, en donde el primer y segundo cebadores definen los extremos del polinucleótido producto polimerizado. Se pueden añadir reactivos a una muestra y enviarlos entonces a través de un puerto de entrada a la cámara de reacción mesoescalar, o los reactivos se pueden enviar a la cámara de reacción independientemente de la muestra a través de un puerto de entrada separado.

La reacción en cadena de la polimerasa se puede realizar, según los procedimientos establecidos en la técnica (Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Se puede utilizar cualquier polimerasa de polinucleótidos termoestable disponible en la técnica. El dispositivo puede incluir medios para variar cíclicamente la temperatura de los contenidos de la cámara de reacción de tal forma que, en cada ciclo, la temperatura se controla para deshibridar el polinucleótido de doble cadena para producir polinucleótido de cadena simple, y entonces anillar los cebadores y permitir la polimerización del polinucleótido.

Aunque se ha descrito y ejemplificado aquí la amplificación de polinucleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se podrá apreciar por personas expertas en la materia que los dispositivos y procedimientos de la presente invención pueden utilizarse con igual efectividad para una variedad de otras reacciones de amplificación de polinucleótidos. Tales reacciones adicionales pueden ser dependientes de la temperatura, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, o pueden llevarse a cabo a una temperatura única (por ejemplo, la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA)). Además, tales reacciones pueden emplear una amplia variedad de reactivos de amplificación y de enzimas, incluyendo ADN ligasa, ARN polimerasa T7 y/o transcriptasa inversa, entre otros. Adicionalmente, la desnaturalización de polinucleótidos se puede efectuar por procedimientos físicos o químicos conocidos, solos o combinados con cambios de temperatura. Las reacciones de amplificación de polinucleótidos que se pueden practicar en el dispositivo de la invención incluyen, pero no se limitan a: (1) procedimientos de amplificación de polinucleótido blanco tales como la replicación de secuencia automantenida (3SR) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); (2) procedimientos basados en la amplificación de una señal unida al polinucleótido blanco, tal como la amplificación de ADN de "cadena ramificada" (Chiron Corp. Emeryville, CA); (3) procedimientos basados en la amplificación de un ADN sonda, tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación de la replicasa QB (QBR); (4) procedimientos basados en la transcripción, tales como la transcripción activada por la ligación (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA); y (5) otros procedimientos de amplificación varios tales como la reacción de reparación en cadena (RCR) y la reacción de la sonda cíclica (CPR) (para un análisis de estos procedimientos y sus fuentes comerciales, ver pp. 2-7 de *The Genesis Report*, DX, Vol. 3, No. 4, Feb. 1994; Genesis Group, Montclair, N.J.).

La capacidad de los dispositivos de la invención es pequeña, permitiendo realizar ensayos en cantidades muy pequeñas de una muestra líquida (por ejemplo, menor que 50 μ l y preferiblemente menos que 10 μ l). Los sistemas de flujo mesoescalares de los dispositivos puede microfabricarse con volúmenes de microlitros, o alternativamente con volúmenes de nanolitros o menos, lo que limita ventajosamente la cantidad de muestra y/o fluidos reactivos requeridos para un ensayo. Los dispositivos se pueden usar para llevar a cabo una variedad de análisis de polinucleótidos automatizados, sensibles y rápidos incluyendo los análisis de polinucleótidos en células o en disolución. A la conclusión del ensayo los dispositivos se pueden limpiar y reutilizar, o se desechan. El uso de dispositivos desechables elimina la contaminación y reduce los riesgos biológicos. La muestra y la mezcla de reacción y pueden permanecer sepultadas todo el tiempo, y el bajo volumen simplifica la eliminación de residuos.

B. Fabricación del Sustrato

Se pueden diseñar y fabricar dispositivos analíticos que constan de un sustrato sólido y opcionalmente, una cubierta dispuesta sobre el sustrato con canales de flujo mesoescalares y cámaras de reacción a partir de una amplia gama de materiales. Los dispositivos se pueden fabricar opcionalmente a partir de un material el cual pueda esterilizarse fácilmente. El silicio proporciona un material útil a causa de la tecnología bien desarrollada que permite su fabricación precisa y eficiente, pero se puede usar una amplia gama de otros materiales dentro del alcance de la invención. Otros materiales que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, arseniuro de galio, fosfuro de indio, aluminio, polisilicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, poliimida y materiales termopares tales como cromo/aluminio, así como cuarzo, vidrio, diamante, poli-

carbonato, poliestireno y otros polímeros como politetrafluoroetilenos. Otros posibles materiales incluyen superaleaciones, zircaloy, acero, oro, plata, cobre, tungsteno, molibdeno, tantalio, KOVAR, cerámicas, KEVLAR, KAPTON, MYLAR, latón, zafiro, o cualquier otro de una gama de plásticos y materiales polímeros orgánicos disponibles en la técnica.

5 El(los) puerto(s), el sistema de flujo mesoescalar, que incluye el(los) canal(es) de flujo de muestra y la(s) cámara(s) de reacción, y otros elementos funcionales se pueden fabricar de forma barata en grandes cantidades a partir de, por ejemplo, un sustrato de silicio por cualquiera de las variedades de procedimientos de micromaquinado conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de
10 micromaquinado disponibles incluyen procedimientos de deposición de películas tales como la deposición en fase vapor química, la fabricación basada en láser o las técnicas fotolitográficas tales como UV, rayos X, procesos LIGA y moldeo plástico, o procedimientos de mordentado los cuales se pueden realizar por procedimientos químicos húmedos o procedimientos de plasma. (Ver, por ejemplo, Manz y col., *Trends in Analytical Chemistry*, 10:144-149 (1991)). La disposición de canales, cámaras, y puertos múltiples
15 facilita la adición secuencial, debidamente temporizada, y volumétricamente correcta de la muestra y los reactivos dentro del dispositivo.

En una realización, se pueden fabricar canales de flujo o cámaras de anchuras y profundidades variables, con al menos una teniendo una dimensión mesoescalar, en un sustrato tal como el silicio. El sustrato
20 que contiene un canal de flujo mesoescalar fabricado y la cámara de reacción se pueden cubrir y sellar con una cubierta de vidrio atornillada, unida anódicamente o adherida de otra manera al sustrato. Se pueden usar otros materiales de recubrimiento transparentes u opacos. Alternativamente, se pueden intercalar dos sustratos, o se puede intercalar un sustrato entre dos cubiertas de vidrio. El uso de una cubierta transparente facilita una ventana la cual facilita la visión dinámica de los contenidos en el sistema de
25 flujo mesoescalar. Se pueden usar otras aproximaciones de fabricación.

C. Procedimientos de Pasivación

Se puede proporcionar un material a la cámara de reacción de amplificación mesoescalar o al canal
30 de flujo para pasivar las superficies de las paredes, es decir, para disminuir la inhibición de la reacción de amplificación por las superficies de las paredes si la naturaleza del material de las paredes necesita tal tratamiento. El material se puede adherir a la superficie de la cámara de reacción o a las paredes de los canales, covalente o no covalentemente. Por ejemplo, las superficies de las paredes se pueden revestir con uno cualquiera de los agentes de silanización de una gama conocidos en la técnica. Alternativamente, se
35 puede proporcionar el material a la cámara en disolución, junto con el polinucleótido de muestra y los reactivos de amplificación durante un análisis. Las cámaras de reacción mesoescalares se pueden fabricar con una relación entre el área superficial de las paredes que definen la cámara de reacción y el volumen de la cámara varía desde alrededor de $3 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ hasta mayor que $10 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$, u, opcionalmente, mayor que $20 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$. Según aumenta la relación entre el área superficial y el volumen, la transmisión de calor
40 a la cámara de reacción a través del sustrato se mejora, y la reacción de amplificación dependiente de la temperatura se puede ciclar más rápidamente. Concurrentemente, sin embargo, también se pueden favorecer los efectos inhibitorios de las superficies de las paredes según la relación entre el área superficial y el volumen aumenta. Los materiales para reducir la inhibición de la reacción de amplificación por una pared de la cámara de reacción son particularmente útiles en cámaras con una gran relación entre el área
45 superficial y el volumen, por ejemplo, mayor que alrededor de $3 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$.

Los expertos en la materia apreciarán que los materiales de pasivación y los procedimientos descritos aquí se aplican sólo a ciertos materiales en donde se ha observado que las reacciones de amplificación pueden mejorarse por pasivación de las superficies de las cámaras de reacción. Algunos materiales que
50 se contemplan para el uso en dispositivos de la invención son naturalmente inertes, y, por tanto, no se beneficiarían de los tratamientos de pasivación descritos aquí.

El sustrato puede constar de un material conductor del calor tal como el silicio o el vidrio. La cámara de reacción y/o las paredes de los canales se pueden pasivar mediante el revestimiento de la superficie
55 con un silano usando un agente de silanización disponible en la técnica. Los agentes de silanización útiles incluyen el dimetilclorosilano (DMCS), dimetildiclorosilano (DMDCS), hexametildisilazano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMCS). Estos clorosilanos pueden reaccionar covalentemente con los grupos hidroxilo superficiales en las paredes que constan de silicio u otro material que pudiera interferir potencialmente con la reacción mediante, por ejemplo, unión al polinucleótido de muestra o a los reactivos de amplifi-
60 cación.

Adicionalmente, a las paredes de las cámaras de reacción y/o de los canales se les pueden propor-

cionar un revestimiento de silicona usando un agente siliconizante disponible comercialmente, tal como AquasilTM o SurfasilTM (Pierce, Rockford, IL), o SigmacoteTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los reactivos siliconizantes disponibles de fabricantes comerciales, tales como Pierce (Rockford, IL) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), son organosilanos que contienen un grupo hidrolizable, el cual se puede hidrolizar en disolución para formar un silanol el cual puede polimerizar y formar una película sobre la superficie de la cámara, y puede reaccionar con grupos hidroxilo en la superficie de la cámara, de tal forma que la película esté estrechamente unida sobre toda la superficie de la cámara.

El revestimiento puede además incluir una macromolécula asociada no covalentemente o covalentemente con el revestimiento, para reducir más los efectos inhibitorios de la pared de la cámara de reacción en la reacción de amplificación. Las macromoléculas útiles incluyen un polímero de aminoácidos, o polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido poliadenílico, o polimaleimida o materiales tales como la maleimida. Otras macromoléculas útiles incluyen, por ejemplo, poli-L-alanina, poli-L-ácido aspártico, poliglicina, poli-L-fenilalanina, o poli-L-triptófano. Se puede proporcionar una película de óxido de silicio en las paredes de la cámara de reacción y/o de los canales para reducir la inhibición de la reacción de amplificación por las superficies de silicio de las paredes. La película de óxido de silicio se puede formar por un procedimiento térmico en donde el sustrato se calienta en presencia de oxígeno. Alternativamente, se puede utilizar una oxidación mejorada con plasma, o un procedimiento de depósito químico por fase vapor. Adicionalmente se puede revestir la cámara de reacción y/o las paredes de los canales con un polímero, tal como el poli(cloruro de vinilo). Por ejemplo, se puede añadir al sistema de flujo mesoescalar una disolución de poli(cloruro de vinilo) en cloroformo, y se puede entonces formar el revestimiento por evaporación del disolvente.

En otra realización, un agente de bloqueo, tal como un polinucleótido o un polipéptido, se puede añadir a la cámara. Por ejemplo, se puede añadir ADN genómico o ácido poliadenílico a la disolución en la cámara de reacción, a una concentración preferiblemente mayor que la concentración del polinucleótido de muestra. Esto permite al polinucleótido ocupar cualquier sitio en las superficies de la pared que podrían potencialmente unirse al polinucleótido de muestra o a los reactivos del ensayo y reducir el rendimiento de la reacción. Si se usa ADN o ARN como polinucleótido de bloqueo, debería estar desprovisto efectivamente de secuencias que pudieran interferir con la reacción de amplificación (es decir, debería contener sustancialmente sólo secuencias no relacionadas con las del polinucleótido de muestra). Otras composiciones que podrían utilizarse como agentes de bloqueo incluyen seroalbúmina bovina o un polímero de aminoácidos, o polímeros tales como la polivinilpirrolidona, o la polimaleimida o composiciones tales como la maleimida.

35 D. Variación Cíclica de la Temperatura

Se puede llevar a cabo una reacción de amplificación de polinucleótidos, tal como una reacción por PCR, en la cámara de reacción del dispositivo 10 mostrado en las Figuras 1A y 2A. Una realización alternativa del dispositivo 10 se ilustra en las Figuras 1B y 2B. Como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 1A, 1B, 2A y 2B, el dispositivo 10 puede incluir un sustrato de silicio 14 microfabricado con los puertos de entrada 16, un canal de flujo mesoescalar 20, y una cámara de reacción 22. La muestra de polinucleótido y los reactivos requeridos para la reacción de polimerización se añaden, y los productos se retiran (si es necesario) a través del canal de flujo 20 desde la cámara de reacción 22 a través de los puertos de entrada 16 los cuales se fabrican en un extremo del canal de flujo 20. El sustrato 14 se cubre, por ejemplo, con una cubierta de vidrio o de plástico 12. El dispositivo 10 se puede usar en combinación con un aparato, tal como el aparato 50 mostrado esquemáticamente en la Figura 3A. El aparato 50 incluye un sitio de acoplamiento 58 para contener al dispositivo 10, y para enlazar los puertos, por ejemplo, los puertos 16 en el dispositivo 10, con una línea de flujo 56 en el aparato. Se usa una bomba 52 en el aparato 50 para enviar una muestra y/o reactivos desde la línea de flujo 56 en el aparato hasta la cámara de reacción 22 por los puertos de entrada 16.

El aparato 50 puede incluir un elemento de calefacción/enfriamiento 57 para controlar la temperatura dentro de la cámara de PCR, por ejemplo, un elemento calefactor eléctrico y/o un serpentín de refrigeración. El elemento de calefacción eléctrica se puede integrar alternativamente en el sustrato 10, con contactos para alimentación acoplados a contactos eléctricos acoplables en el aparato debajo de la cámara de reacción 22. Alternativamente, como se muestra en la Figura 3B, el aparato puede incluir un medio de calefacción 53, tal como un láser, un calentador Peltier, o una fuente de energía electromagnética, dispuesta sobre o adyacente a la cámara de reacción en el dispositivo 10. El calentador también se puede disponer en el aparato debajo de la cámara de reacción. Se puede usar un microprocesador en el aparato para regular el elemento calefactor para proporcionar un ciclo de temperatura en la cámara de amplificación entre una temperatura adecuada para la deshibridación, por ejemplo, 94°C, y una tempe-

ratura adecuada para el anillamiento y la polimerización, por ejemplo, 40-60°C para el anillamiento y 70-75°C para la polimerización. Se puede proporcionar también un termopar, termistor o termómetro de resistencia en el sustrato en contacto eléctrico con el aparato, para permitir al microprocesador detectar y mantener los ciclos de temperatura en la cámara de reacción. Se pueden combinar ventajosamente el calentamiento y la medición mediante el uso de un único elemento, por ejemplo un termómetro de resistencia, para ambos propósitos, combinando calor y medición simultáneamente o en una base multiplexada.

También se puede incluir en el aparato un elemento refrigerante, tal como una bomba de calor termoeléctrica en miniatura (Materials Electronic Products Corporation, Trenton, Nueva Jersey), un termopar Peltier o un dispositivo de enfriamiento Joule Thompson, para ajustar la temperatura de la cámara de reacción. En otra realización, en el aparato mostrado en la Figura 3B, la temperatura de la cámara de reacción se puede regular mediante un pulso de láser temporizado dirigido a la cámara de reacción a través de la cubierta de vidrio 12, de tal manera que permite el calentamiento y enfriamiento secuencial de la muestra a las temperaturas requeridas para el ciclo de amplificación del polinucleótido. Adicionalmente, el calentamiento y el enfriamiento se pueden combinar ventajosamente mediante el uso de termopares Peltier para proporcionar ambas funciones. Las propiedades térmicas del silicio permiten ciclo rápido de calentamiento y enfriamiento. El uso de cámaras de reacción fabricadas con una relación de área superficial a volumen alta, por ejemplo, mayor que $3 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$, es ventajosa, dado que se facilita la transmisión de calor desde y hasta los contenidos de la cámara de reacción. Esto mejora la eficiencia de la variación cíclica de temperatura y la productividad de la reacción de amplificación dentro de la cámara.

Como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 4, 5 y 6A, se puede microfabricar una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos mesoescalar con múltiples secciones, por ejemplo, dos secciones 22A y 22B, conectadas por el canal de flujo 20B. En esta realización, la sección 22A se calienta hasta o se mantiene a una temperatura adecuada para la deshibridación y la sección 22B se calienta hasta o se mantiene a una temperatura adecuada para el anillamiento y la polimerización. Durante un análisis, el dispositivo se puede situar en el aparato 50 (Figura 6A). Al aparato 50 se le proporcionan medios 57 para controlar la temperatura de las secciones de la cámara de reacción. Alternativamente, se puede usar un láser para calentar las secciones. Se puede incluir un termopar u otro dispositivo de medida de temperatura en el sustrato para seguir las temperaturas de las secciones de la cámara de reacción, y su salida se puede usar para controlar la entrada térmica, por ejemplo, con ayuda de un microprocesador.

En operación, se usa una bomba 52 en el aparato para enviar la muestra de polinucleótido y los reactivos requeridos desde la línea de flujo 56 a través del puerto de entrada 16A a la sección 22A. La bomba 52, la cual se puede también controlar por un microprocesador en el aparato, se usa entonces para transferir la muestra periódicamente, entre las secciones 22A y 22B, a través del canal 20B, para realizar un ciclo de reacción de amplificación de polinucleótidos repetitiva, mientras que el puerto 16B sirve como respiradero. Cuando la reacción se completa, la bomba 52 en el aparato 50 se puede usar para enviar la muestra a través del puerto 16B y la línea 56 en el aparato hasta el puerto 59 para recuperar el producto. Por supuesto, se pueden usar tres o más cámaras, cada una de las cuales se mantiene a una temperatura adecuada para llevar a cabo una reacción particular.

En el dispositivo 10 mostrado en las Figuras 4, 5 y 6B, se puede usar un elemento calefactor para calentar la sección 22A hasta una temperatura adecuada para la deshibridación del ADN de doble cadena, por ejemplo, 94°C, mientras que la sección 22B y el canal 20B, el cual conecta las secciones 22A y 22B, se separan de la sección 22A de forma que en el transporte de una muestra calentada desde la sección 22A hasta la 22B, el calor se disipa suficientemente para permitir que la temperatura de la muestra caiga hasta la temperatura requerida para el anillamiento y la polimerización antes de que la muestra se retorne a la sección 22A para una mayor ciclación. Esto se puede conseguir rápidamente dado que el silicio tiene una conductividad térmica relativamente alta y el área de la interfase entre la muestra líquida y el sustrato es bastante alta. En esta realización, los microprocesadores en el aparato 50 se usan para controlar la bomba 52, la cual regula el ciclo de flujo de la muestra entre las secciones 22A y 22B. Así, un equilibrio térmico dinámico crea un gradiente de temperatura a lo largo del camino de flujo entre las cámaras, y se consiguen temperaturas apropiadas en ambas usando una única fuente calefactora. Son posibles otros diseños. Por ejemplo, el anillamiento y de polimerización se pueden ejecutar en diferentes secciones de una única cámara, fijadas a diferentes temperaturas optimizadas.

E. Puertos de Tránsito de Fluidos de Sellado

Los dispositivos incluyen un sustrato sólido fabricado con una cámara de amplificación de polinucleótidos mesoescalar. Los dispositivos incluyen además al menos un puerto de entrada de muestra, y

un canal de flujo de muestra conectando el puerto de entrada con la cámara de reacción. Uno o más puertos y canales de flujo en el dispositivo se pueden fabricar dentro del sustrato (Figura 1A) o en una cubierta dispuesta sobre el sustrato (Figura 1C). La cubierta puede constar de, por ejemplo, un material transparente, tal como vidrio o cualquiera de una gama de materiales plásticos disponibles en la técnica.

5 La invención proporciona medios para sellar uno o más de los puertos durante una reacción de amplificación, para impedir la evaporación de líquidos durante la variación cíclica de la temperatura. En una realización, se proporciona un aparato de liberación de fluido para enviar fluido hasta y desde la cámara de reacción a través del puerto, el cual está adaptado para ajustarse a y/o encajar en el puerto, y el
10 cual puede sellar reversiblemente el puerto después de la liberación de fluido a la cámara de reacción. Se puede utilizar una jeringa o una pipeta capaz de ajustarse a y sellar un puerto de entrada/salida de fluido en el sustrato.

Como se ilustra en las Figuras 19 y 22, en una realización, la cubierta 12 se puede fabricar con la
15 cavidad 87 para ajustarse a y recibir una pipeta 8. La pipeta 86 puede estar provista de una punta de pipeta 84 la cual incluye una apertura 88 para transferir fluido desde la punta de pipeta 84 a través de canal de flujo 20A en la cubierta hasta el canal de flujo 20B y la cámara de reacción de amplificación 22 en el sustrato 14, cuando la pipeta está encajada en la cavidad 87. La punta de pipeta puede ser
20 opcionalmente liberable de la pipeta, y puede ser desechable para evitar la contaminación entre muestras.

Como se ilustra en la Figura 20, la apertura 88 se puede posicionar en una pared lateral de la punta de pipeta 84, para permitir a la punta de pipeta, en una pipeta encajada en la cavidad 87 en el dispositivo
10 mostrado en la Figura 22, moverse entre una primera posición la cual permite la transferencia de fluido desde la punta a través de la apertura 88 al canal de flujo 20A y hasta la cámara de reacción 22, y una segunda posición para permitir a la apertura mirar hacia una pared de la cavidad 87, sellando de
25 este modo el canal 20A y la cámara 22 durante una reacción. Adicionalmente, se puede proporcionar un miembro 85 depresible, el cual se extiende desde el sustrato, y el cual es capaz de sellar el puerto por depresión del miembro 85, como se ilustra en la Figura 21.

Los dispositivos que constan de puertos de transferencia de fluido sellados como los descritos arriba se pueden utilizar para una variedad de propósitos aparte de la amplificación de polinucleótidos. Por
30 ejemplo, tales puertos se pueden emplear en un dispositivo separado para la preparación de la muestra, inmunoensayo, o ambos, como se describe en la Solicitud de propiedad común co-pendiente No. de Serie [aún no asignado], la descripción de la cual se ha incorporado aquí por alusión.

35 F. Detección de Polinucleótidos Amplificados

El polinucleótido amplificado presente en la cámara de reacción se puede detectar mediante una gama de procedimientos conocidos en la materia para detectar polinucleótidos, tales como electroforesis en gel
40 de agarosa en presencia de bromuro de etidio. En una realización, el polinucleótido amplificado producto se puede detectar directamente en la cámara de reacción, usando reactivos disponibles comercialmente desarrollados para tal propósito (por ejemplo, reactivos "Taq Man"TM, Perkin Elmer Corporation). Los dispositivos también pueden estar provistos de medios para detectar polinucleótidos amplificados dispuestos en el sustrato o en un aparato usado en combinación con el sustrato. La presencia de polinucleótido
45 amplificado producto en el aparato se puede detectar por uno cualquiera de los procedimientos que incluyen, pero no se limitan a: (1) seguimiento de la presión o la conductividad eléctrica de fluidos de muestra que entran y/o salen de la cámara de reacción en el sistema de flujo mesoescalar; (2) formación de un complejo detectable, por ejemplo, uniendo el polinucleótido producto con una sonda marcada, tal como un oligonucleótido marcado o una sonda de anticuerpo; y (3) separación por electroforesis del
50 polinucleótido producto de los reactivos y otros componentes de la muestra.

Los dispositivos analíticos también se pueden utilizar en combinación con un aparato para ver los contenidos de los canales mesoescales en los dispositivos. El aparato en una realización puede constar de un microscopio para ver los contenidos de los canales mesoescales en los dispositivos. En otra
55 realización, se puede incluir una cámara en el aparato, como se ilustra en el aparato 60 mostrado esquemáticamente en las Figuras 17 y 18. El aparato 60 está provisto de una carcasa 62, una pantalla de visualización 64 y una ranura 68 para insertar el dispositivo al aparato. Como se muestra en sección transversal en la Figura 18, el aparato 60 también incluye una videocámara 68, y un sistema óptico 70, y un mecanismo basculante 72 para contener al dispositivo 10, y permitir ajustar manualmente la situación
60 y el ángulo del dispositivo 10. El sistema óptico 70 puede incluir un sistema de lentes para aumentar los contenidos de los canales, así como una fuente de luz. La videocámara 68 y la pantalla 64 permiten el seguimiento visual y la grabación opcional usando del aparato de los cambios en las propiedades del

fluido de muestra, tales como propiedades de flujo o color, inducidas por la presencia del producto de amplificación de polinucleótidos. Adicionalmente, se puede seguir la adición o eliminación de muestras fluidas a o desde las cámaras de reacción, por ejemplo, ópticamente, usando el aparato.

5 En una realización, se puede detectar el polinucleótido amplificado producto usando una cámara de detección fabricada en el sistema de flujo mesoescalar en el sustrato en comunicación fluida con la cámara de reacción. La cámara de detección está provista de un agente formador de complejos por ejemplo, un componente aglutinante capaz de aglutinarse con el polinucleótido amplificado para formar un complejo detectable. El componente aglutinante puede constar de, por ejemplo, una sonda de anticuerpo o polinucleótido. La cámara de detección se puede fabricar según los procedimientos descritos en el documento
10 U.S. No. Serie 07/877,702 presentado el 1 de mayo, 1992, la descripción del cual se incluye aquí por alusión. En otra realización, el agente formador de complejos puede añadirse a la cámara de reacción después de que la reacción se completa, para formar un complejo detectable en esa cámara. El dispositivo se puede usar en combinación con un detector tal como un aparato que contenga un microprocesador
15 para detectar y grabar los datos obtenidos durante un ensayo.

En una realización, la cámara de detección mesoescalar puede estar provista de un sustrato inerte, por ejemplo, una perla u otra partícula, capaz de unirse al polinucleótido producto, para causar una aglomeración detectable de las perlas en presencia del polinucleótido polimerizado producto. La aglomeración
20 inducida de las partículas se puede mejorar mediante la unión de un componente aglutinante, tal como un anticuerpo, a la partícula.

Los anticuerpos u otros componentes aglutinantes capaces de unirse al polinucleótido producto se pueden introducir en la cámara de detección, o pueden revestirse, químicamente o por adsorción, en la
25 superficie de la región de detección, o alternativamente, en la superficie de una partícula inerte en la región de detección, para inducir la unión, proporcionando un ensayo positivo para el polinucleótido. Las técnicas para la activación química de superficies silíceas están bien desarrolladas, particularmente en el contexto de la cromatografía. (Ver, por ejemplo, Haller en: *Solid Phase Biochemistry*, W.H.Scouten, Ed., John Wiley, Nueva York, pp 535-597 (1983); y Mandenius y col., *Anal. Biochem.* 170: 68-72 (1988)). En
30 una realización, el componente aglutinante puede constar de un anticuerpo, y se pueden realizar en la región de detección técnicas de inmunoensayo conocidas en la técnica. (Ver, por ejemplo, Bolton y col., *Handbook of Experimental Immunology*, Weir D.M., Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1986, Vol. 1, Capítulo 26, para una exposición general sobre los inmunoensayos)

35 Se puede adjuntar al componente aglutinante un marcador detectable ópticamente tal como una molécula fluorescente o una perla fluorescente para mejorar la detección del polinucleótido amplificado producto. Alternativamente se puede enviar a través del sistema de flujo una segunda sustancia marcada, tal como un anticuerpo marcado fluorescentemente para unir al complejo ligado polinucleótido/componente aglutinante en la región de detección para producir un "emparedado" que incluya
40 un componente detectable ópticamente indicativo de la presencia del analito. La unión del polinucleótido amplificado al componente aglutinante en la región de detección se puede detectar, por ejemplo, visualmente o por máquina, a través de una ventana transparente dispuesta sobre la región de detección. En una realización, la producción de polinucleótido amplificado se puede detectar mediante la adición de un tinte tal como bromuro de etidio, el cual exhibe fluorescencia mejorada en unión al un polinucleótido de
45 doble cadena. Higuchi y col. *Biotechnology*, 10:413 (1992).

La cámara de detección también puede estar provista de un polinucleótido complementario marcado capaz de unirse a una de las cadenas del polinucleótido amplificado, por ejemplo, un polinucleótido marcado inmovilizado en una perla, para permitir la detección del polinucleótido amplificado producto por
50 medio de la aglutinación de perlas. Se pueden utilizar las técnicas de hibridación de polinucleótidos conocidas en la técnica. Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, 1989); Vener y col., *Anal. Chem.*, 198:308-311 (1991). Se pueden adjuntar sondas de polinucleótido a, por ejemplo, una partícula de látex submicrónica. Wolf y col., *Nucleic Acids Research*, 15:2911-2926 (1987).

55 En otra realización, los productos de amplificación de polinucleótidos se pueden separar de los reactivos y otros componentes de la muestra original mediante procedimientos electroforéticos adaptables a los dispositivos mesoescalares de la invención. Tales técnicas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se han fabricado perforaciones microlitográficas en SiO₂ con el propósito de separar electroforéticamente
60 moléculas de ADN (Volkmut & Austin, *Nature* 358:600-602, 1992). Adicionalmente, se han microfabricado placas de vidrio con varias combinaciones de canales para realizar electroforesis capilar para separar varias moléculas biológicas (Harrison y col., *Science* 261: 895-897, 1993).

En esta realización, los dispositivos de la invención se pueden fabricar con una región de detección que consta de un reticulado microlitográfico o una serie de canales, y se puede realizar la electroforesis en la placa proporcionando un campo eléctrico apropiado a través de la región (por ejemplo, situando 5 microelectrodos en cualquier terminación de la región de detección). La región está provista de un área de carga en una terminación para recoger los contenidos de la cámara de reacción antes de la electroforesis. Los componentes varios de la mezcla de reacción se separan entonces unos de los otros por electroforesis. El producto de amplificación de polinucleótidos se puede identificar por comparación de tamaño con moléculas de tamaño conocido. En una realización, se introducen marcadores de tamaño en la región 10 de detección (por medio de un puerto de acceso), se separan electroforéticamente, y los resultados se graban y se almacenan (por ejemplo en la memoria del ordenador). Los contenidos de la cámara de reacción se transfieren entonces a la región de detección, se separan electroforéticamente, y los resultados se graban y se comparan con los resultados de la electroforesis de los marcadores de tamaño. De esta manera, se puede identificar un producto de amplificación de polinucleótidos, así como purificarse para su 15 uso posterior, sin el uso de sustancias inertes y componentes aglutinantes para capturar el polinucleótido producto.

La amplificación del polinucleótido también se puede detectar usando una región de detección sensible a la restricción de flujo causada por la presencia del polinucleótido producido en la cámara de reacción, 20 como se describe en el documento U.S. Solicitud No. de Ser. 08/250,100, la descripción de la cual se ha incorporado aquí por alusión. La presencia de un polinucleótido amplificado también se puede detectar midiendo la presión o la conductividad eléctrica de las muestras fluidas que entran y salen del sistema de flujo. La conductividad se puede medir, por ejemplo, usando contactos eléctricos los cuales se extienden a través del sustrato y los cuales se acoplan a contactos eléctricos en un aparato usado en combinación 25 con el dispositivo. Los contactos eléctricos se pueden fabricar mediante técnicas conocidas, tales como varios procedimientos de fusión zonal de gradiente térmico. (Ver Zemel y col., en: *Fundamentals and Applications of Chemical Sensors*, D. Schuetzle y R. Hammerle, Eds., ACS Symposium Series 309, Washington, DC, 1986, p. 2.)

Se pueden detectar el polinucleótido amplificado en la cámara de reacción siguiendo la presión de los fluidos de muestra. Por ejemplo, en un dispositivo 10, encajado en el aparato 50, ilustrado esquemáticamente en la Figura 6A, los detectores de presión 54 conectados al fluido de muestra que entra y sale el sistema de flujo mesoescalar a través de los puertos 16 permitirán la detección de descensos de presión causados por la presencia del producto polimerizado y la resultante obstrucción o restricción de 35 flujo. También se puede fabricar un detector de presión mesoescalar directamente en el sustrato de silicio. Angell y col., *Scientific American* 248: 44-55 (1983).

La amplificación de polinucleótidos se puede detectar mediante el uso de un sistema de flujo mesoescalar sensible a la restricción de flujo, construido con un modelo "fractal", es decir, un modelo de canales 40 de flujo divergentes. Los canales se pueden fabricar en un sustrato de silicio para tener dimensiones progresivamente reducidas, proporcionando canales de flujo progresivamente más estrechos. Se apreciará por los expertos en la materia que, aunque se ejemplifican los canales bifurcantes, los dispositivos se pueden fabricar con diferente número de canales de flujo paralelos u otros modelos simétricos o asimétricos de canales de flujo con áreas transversales reducidas. Alternativamente, se puede utilizar un único canal que 45 consta de una región más estrecha, como se describe en la Solicitud de propiedad común U.S. Ser. No 08/250,100 (incorporado aquí por alusión).

La Figura 7 muestra una vista plana esquemática de un sustrato 14 fabricado con un sistema de canales de flujo 40 conectados por los canales 20 a los puertos 16 y una cámara de reacción que consta de 50 las secciones 22A y 22B. La presencia de polinucleótido amplificado producto en una muestra influirá en las características de flujo dentro de los canales de flujo. Los canales 40 en esta realización se disponen simétricamente y tienen un diámetro progresivamente más estrecho hacia el centro del patrón. El flujo a través de este modelo de canales es sensible a los cambios en la viscosidad del fluido causados por la presencia del polinucleótido amplificado producto. Alternativamente, se puede utilizar un sistema de canales 55 de flujo más complejo, como se ilustra en la Figura 13. La Figura 13 ilustra un par de sistemas de canales de flujo 40A y 40B. El sistema de canales 40A se construye con canales de flujo progresivamente más estrechos hacia el centro del modelo, resultando en una sensibilidad a la restricción del flujo mejorada.

La restricción del flujo se puede detectar, por ejemplo, ópticamente, a través de una cubierta transparente sobre la sección de detección. Alternativamente, se pueden utilizar uno o más detectores de presión 60 para detectar los cambios de presión debidos a cambios en las propiedades del fluido causadas por la acumulación de polinucleótido amplificado en o más allá de los caminos de flujo restringido. También

se pueden detectar rápidamente los cambios de la conductividad en la amplificación de polinucleótidos mediante detectores de conductividad eléctrica en contacto con la región de flujo. Por ejemplo, la obstrucción de la región restringida 40, el cual bloquea el flujo desde el puerto de entrada 16A al puerto de salida 16B, se podría detectar mediante una sonda de conductividad convencional 17 cuya salida es indicativa de la presencia o ausencia de fluidos acuosos en el canal de descarga. Se pueden incluir en la región de flujo restringido componentes aglutinantes tales como anticuerpos marcados o sondas de polinucleótidos, por ejemplo, inmovilizados, o en un reactivo en fase sólida tal como una perla, para unirse al polinucleótido amplificado para inducir la reducción de flujo en el camino de flujo restringido.

En una realización, el sistema de flujo mesoescalar incluye una cámara para lisar células de una muestra para preparar un análisis de polinucleótidos aguas abajo. Los dispositivos también pueden incluir una región adaptada para separar un tipo particular de células en una población celular heterogénea. La región de separación celular incluye componentes aglutinantes inmovilizados en estructuras dentro del sustrato las cuales se unen selectiva y reversiblemente a una célula blanco por una molécula superficial celular característica, tal como una proteína. Otras células en la muestra pasan aguas abajo y se canalizan a un depósito o a través de un puerto de salida. El flujo se puede continuar para lavar las células, por ejemplo, con un flujo de tampón. A altas velocidades de flujo y presiones, o cambiando la composición del disolvente, las células lavadas se liberan de las estructuras en las cuales se inmovilizaron, y después de eso se mueven desde la región de separación celular aguas abajo hasta un medio de lisis, el cual lisa las células antes del análisis por PCR de ARN o ADN intracelular.

El medio de lisis celular se dispone típicamente en el camino de flujo entre la región de separación celular (si hay) y la cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos para permitir que las células se lisen antes del análisis de un polinucleótido intracelular. Como se ilustra en la Figura 9, el medio de lisis celular puede constar de protrusiones de rotura de la membrana celular 90 que se extienden desde la superficie de un canal de flujo 20. Según se fuerza el fluido a través de la protrusión de rotura 90, las células se rompen. En otra realización, los medios de lisis celular pueden constar simplemente de una región de dimensión transversal restringida la cual ejecuta la lisis celular bajo aplicación de suficiente presión de flujo. El medio de lisis celular puede también constar de piezas de silicio con ángulos afilados atrapadas dentro de una cámara de lisis mesoescalar. Un aparato el cual incluye medios, tales como una bomba, para forzar la muestra que contiene células hasta el medio de lisis celular, causa la lisis celular bajo aplicación de una suficiente presión de flujo, y envía subsecuentemente la muestra a través del sistema de flujo hasta la cámara de reacción. En otra realización, el medio de lisis celular puede constar de un agente de lisis celular. Se pueden utilizar los agentes de lisis celular conocidos en la técnica.

Se pueden añadir reactivos a la cámara de reacción desde un puerto de entrada separado en el sustrato en comunicación fluida con la cámara de reacción. Se puede usar un filtro, microfabricado en el canal de flujo en el sustrato, para filtrar los desechos celulares antes del análisis de polinucleótidos. En una realización, mostrada en las Figuras 14, 15 y 16, el filtro 24 en el dispositivo 10 puede constar de un canal de flujo mesoescalar de diámetro reducido en comparación con el canal 20. En operación, la muestra fluye desde el canal de flujo de muestra 20A a través del filtro 24. El filtrado de muestra sale entonces del filtro 24 y fluye a través del canal 20B. El filtro 24 está microfabricado con canales rectos o tortuosos que tienen unas profundidades y anchuras preferidas del orden de 0,1 a 50 μm , y los canales de flujo amplios 20A y 20B, los cuales tienen unas profundidades y anchuras máximas del orden de aproximadamente 500 μm . Como se ilustra en la Figura 8, la superficie de un canal de flujo 20 también puede incluir protrusiones 80 que constituyen un tamiz celular para separar las células por tamaño aguas arriba de la cámara de análisis por PCR. Según las muestras celulares fluyen a través del canal de flujo, típicamente bajo baja presión, sólo las células suficientemente pequeñas para pasar entre las protrusiones 80 alcanzan los elementos funcionales aguas abajo. Estas células pueden enviarse subsecuentemente a través de una región de lisis celular, después a una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos para análisis.

En otra realización, se pueden proporcionar perlas paramagnéticas o ferromagnéticas dentro del sistema de flujo mesoescalar, las cuales se pueden mover a lo largo del sistema de flujo mediante un campo magnético externo, por ejemplo, en el aparato. Las perlas se pueden usar para transportar reactivos entre los elementos funcionales en el dispositivo, o para desplazar una muestra, un reactivo o una mezcla de reacción. En una realización, se puede inmovilizar una sonda de polinucleótido en las perlas magnéticas permitiendo a las perlas unirse al polinucleótido amplificados. Las perlas magnéticas que constan de un revestimiento de sonda de polinucleótido se pueden transportar a través del sistema de flujo hasta la cámara de reacción al final de un ensayo para unirse con el polinucleótido amplificado producto. El polinucleótido amplificado ligado se puede transportar entonces en las perlas magnéticas hasta una cámara de detección o purificación en el sistema de flujo, o hasta un puerto de recogida.

Aparatos de Ejemplo

Una realización de la invención, ilustrada en la Figura 10, es un dispositivo 10 que consta de un sustrato 14 microfabricado con una cámara de amplificación de polinucleótidos mesoescalar que consta de las secciones 22A y 22B, las cuales se conectan mediante el camino de flujo 20B. El dispositivo 10 se usa en combinación con un aparato, tal como el aparato 50, mostrado en la Figura 6A, el cual contiene un sitio de acoplamiento para contener el dispositivo. El aparato 50 está provisto de los caminos de flujo 56 acoplados a los puertos 16A, 16B, 16C y 16D en el dispositivo 10. El aparato también incluye válvulas que permiten a los puertos 16A, 16B, 16C y 16D abrirse y cerrarse mecánicamente. El puerto 16E se incluye para añadir reactivos a la cámara de detección 22C. En una realización, los sistemas de flujo de los dispositivos se pueden mantener a un volumen hidráulicamente completo, y las válvulas en el aparato, o alternativamente, en los dispositivos, se pueden utilizar para dirigir el flujo de fluido. Las secciones 22A y 22B de la cámara de PCR se calientan hasta, por ejemplo, 94°C y 40-65°C, respectivamente, para proporcionar una temperatura de desnaturalización y una temperatura de anillamiento según se requiere para la PCR y otras reacciones de amplificación dependientes de la temperatura. Como se expuso arriba, las secciones de la cámara de reacción se pueden calentar por medio de un elemento eléctrico integrado en el sustrato debajo de las secciones, el cual puede acoplarse a los elementos eléctricos en el aparato. Alternativamente, se puede usar un láser óptico para calentar las secciones de la cámara de reacción a través de una cubierta de vidrio dispuesta sobre el sustrato. Se puede proporcionar en el sustrato un detector calorífico, en contacto eléctrico con el aparato. Se puede usar un microprocesador en el aparato para controlar la temperatura de las secciones de la cámara de reacción y el flujo de fluido en el sistema de flujo.

Los canales de flujo del dispositivo 10 están equipados con los filtros 24A, 24B y 24C. El filtro 24A está diseñado para evitar que entren en la cámara de reacción los desechos celulares y otra materia particulada no deseada en la muestra. Los filtros 24B y 24C se incluyen con el propósito de retener el agente formador de complejos (es decir las perlas 92) dentro de la cámara de detección 22C. De acuerdo con esto, los filtros 24A, 24B y 24C no necesitan ser idénticos.

En operación, para una reacción de amplificación dependiente de la temperatura tal como la PCR, inicialmente, con los canales las cámaras llenos de tampón, los puertos 16A y 16C están abiertos mientras que los puertos 16B y 16D están cerrados. Una bomba 52 en el aparato envía el fluido de muestra y/o los reactivos requeridos para la amplificación, tales como la polimerasa Taq, los cebadores y los nucleósidos trifosfato, por el puerto 16A, a través del filtro 24A, hasta la sección de la cámara de reacción 22A. Seguidamente se cierra el puerto 16A y se abre el puerto 16B, y se usa la bomba 52 en el aparato para bombear alternativamente el flujo de fluido en ciclos a través del canal de flujo 20B entre la sección 22A, donde ocurre la deshibridación del polinucleótido, y la sección 22B, donde ocurren la polimerización y el anillamiento. Se puede usar el puerto 16C para ventilar el sistema, y también opcionalmente para enviar la polimerasa Taq, los nucleósidos trifosfato, los cebadores y otros reactivos. Cuando la reacción cíclica de amplificación se termina, por ejemplo, después de 30-35 ciclos, se cierra el puerto 16C y se abre el puerto 16D, y se acciona la bomba en el aparato para enviar los productos de reacción desde las secciones 22A y 22B de la cámara de reacción hasta la cámara de detección 22C, la cual contiene, por ejemplo, un polinucleótido complementario a las cadenas sentido y antisentido amplificadas, inmovilizado en las perlas 92. El producto de amplificación se detecta observando la aglutinación de las perlas 92, por ejemplo, visualmente a través de una cubierta transparente dispuesta sobre la región de detección.

Se ilustra otra realización en la Figura 10B. La función, estructura y operación de este dispositivo es similar al mostrado en la Figura 10A, exceptuando que consta de una región de detección 26, en donde se pueden fabricar canales o perforaciones (no mostrados) para realizar la separación por electroforesis del producto de amplificación de polinucleótidos. El dispositivo incluye un puerto 16E para añadir o retirar materiales de la región de detección. El dispositivo se usa en combinación con un aparato similar al aparato 50, mostrado en la Fig. 6A, el cual consta además de medios para aplicar un campo eléctrico a través de la región de detección 26.

Se ilustra otra realización en la Figura 11. La función, estructura y operación de este dispositivo es similar al mostrado en la Figura 10, exceptuando que consta de una única cámara de reacción 22A. El dispositivo se usa en combinación con un aparato tal como el aparato 50 mostrado en la Figura 3A. El dispositivo incluye medios para calentar y enfriar la cámara de reacción 22A alternativamente hasta una temperatura requerida para la desnaturalización y una temperatura requerida para el anillamiento y la polimerización.

En operación, se usa el aparato para enviar una muestra que contiene polimerasa y otros reactivos

requeridos para reacciones tales como la PCR a través del puerto de entrada 16A hasta la cámara de reacción 22A. Los puertos 16A y 16D se cierran entonces utilizando una válvula conectada en el aparato. Se utiliza entonces el elemento calefactor en el aparato para variar cíclicamente la temperatura de la cámara de reacción entre una temperatura adecuada para la deshibridación y una temperatura adecuada para el anillamiento y la polimerización. Cuando terminan los ciclos de amplificación, los puertos 16B y 16D se abren y la muestra se envía a la cámara de detección 22B la cual contiene una sonda de polinucleótido, por ejemplo, inmovilizada en perlas 92 o en otro sustrato sólido. Un ensayo positivo para el polinucleótido se indica por la aglutinación del sustrato sólido (por ejemplo, perlas) en la cámara de detección. En la realización mostrada en la Figura 10B, los contenidos de las secciones de la cámara de reacción 22A y 22B se envían a la sección de detección 26, donde el polinucleótido producto se separa electroforéticamente y se identifica.

La invención se entenderá mejor con los siguientes ejemplos, no limitantes.

15 Ejemplo 1

Se realiza una reacción en cadena de la polimerasa en el dispositivo ilustrado esquemáticamente en la Figura 11, provisto de una cámara de reacción mesoescalar 22A. Para realizar un análisis por PCR para detectar un polinucleótido en una célula, se añade una muestra de lisado celular a una disolución tamponada de polimerasa Taq, nucleósidos trifosfato, polinucleótidos cebadores y otros reactivos requeridos para la PCR. El lisado de la muestra celular se envía por el aparato a través de un puerto de entrada 16A hasta una cámara de reacción por PCR 22A. Los puertos 16A y 16D se cierran por medio de unas válvulas incluidas en el aparato. Se usa un microprocesador y un elemento de control de la temperatura para ejecutar un ciclo de temperatura en la cámara de reacción 22A entre 94°C, para la deshibridación del polinucleótido, 40-60°C para el anillamiento y 70-75°C para la extensión del cebador.

Después de completarse la reacción en cadena de la polimerasa, se abren los puertos 16B y 16D, y se conecta la bomba en el aparato al puerto 16B usado para enviar la muestra desde la cámara de reacción por PCR 22A a través del canal de flujo 20B hasta la cámara de detección 22B. La cámara de detección 22B contiene las perlas 92 que constan de un polinucleótido complementario inmovilizado en la superficie capaz de unirse al polinucleótido amplificado. La aglutinación de las perlas causada por la reacción de hibridación entre el polinucleótido amplificado y el polinucleótido complementario se observa a través de una ventana dispuesta sobre la región de detección 22B, y proporciona un ensayo para la presencia del polinucleótido amplificado producto.

35 Ejemplo 2

La Figura 12 describe esquemáticamente un dispositivo 10 que incluye un sustrato 14 usado para separar un ácido nucleico de una subpoblación celular en una mezcla en una muestra de fluido biológico, y realizar entonces un ensayo para una secuencia de nucleótidos particular. Hay un camino de flujo mesoescalar 20 microfabricado en el dispositivo 10 el cual incluye una cámara de separación celular 22A, una cámara de lisis celular 22B, una región de filtrado 24, una cámara de reacción por PCR que consta de las secciones 22C y 22D, y una región de detección de flujo restringido 40. El sistema de flujo mesoescalar 20 está también provisto de puertos de entrada/salida fluida 16A, 16B, 16C y 16D. El dispositivo se usa en combinación con un aparato, tal como el aparato 50, mostrado en la Figura 6A.

Inicialmente, las válvulas en el aparato se usan para cerrar los puertos 16C y 16D, mientras que los puertos 16A y 16B están abiertos. Se dirige una muestra que contiene una mezcla de células al puerto de entrada de muestra 16A mediante la bomba 52 en el aparato, y fluye a través del camino de flujo mesoescalar 20 hasta la cámara de separación 22A. La cámara 22A contiene componentes aglutinantes inmovilizados en la pared de la cámara los cuales se unen selectivamente a una molécula superficial en un tipo celular deseado en la muestra. Los restantes componentes celulares salen del sustrato por el puerto 16B. Después de la aglutinación de la población celular deseada en la cámara 22A, se continúa el flujo con el tampón, para lavar y asegurar el aislamiento de la población celular. Después se cierra en puerto 16B y se abre el puerto 16C. Entonces se incrementa el flujo suficientemente para desalojar las células inmovilizadas. El flujo se continúa, forzando las células a través de unas protrusiones de rotura de la membrana 90 en la cámara 22B, las cuales abren las células liberando el material intracelular.

El flujo de la muestra continua más allá del filtro 24, el cual elimina por filtrado los componentes grandes de la membrana celular y otros desechos, a la sección 22C de la cámara mesoescalar de PCR, la cual está conectada con la sección 22D de la sección de la cámara de PCR por el canal de flujo 20B. Luego se añaden a la sección 22D a través del puerto 16B la polimerasa Taq, los cebadores y otros reac-

tivos requeridos para el ensayo por PCR desde un puerto acoplado y un camino de flujo en el aparato, permitiendo la mezcla de los componentes solubles intracelulares de la subpoblación separada de células y los reactivos de PCR. Con el puerto 16A cerrado, se usa una bomba en el aparato conectada por el puerto 16B para variar cíclicamente la muestra de PCR y los reactivos a través del canal de flujo 20B entre las secciones 22C y 22D, fijadas a, por ejemplo, 94°C y 65°C respectivamente, para ejecutar ciclos múltiples de desnaturalización, anillamiento y polimerización de los polinucleótidos, permitiendo la amplificación del polinucleótido producto. Alternativamente, se pueden cerrar todos los puertos durante la reacción de amplificación y se puede realizar la variación cíclica de temperatura como se describió en el Ejemplo 1 arriba. Las válvulas en el aparato se usan después para abrir el puerto 16D. La bomba en el aparato conectada al puerto 16B se usa entonces para dirigir el polinucleótido amplificado aislado de la población celular hasta una región de detección que consta de una serie bifurcante de caminos de flujo 40. La restricción de flujo en la región de detección 40 sirve como un indicador positivo de la presencia del polinucleótido amplificado producto y se detecta ópticamente a través de una cubierta de vidrio dispuesta sobre la región de detección.

15 Ejemplo 3

Se examinó la amplificación de un polinucleótido de muestra, (ADN del bacteriófago lambda) en una cámara de reacción mesoescalar, que tenía unas dimensiones de 80 μ m de profundidad, 8 mm de anchura y 14 mm de longitud, fabricada en un sustrato de silicio y pasivada usando diferentes procedimientos de pasivación.

Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron los reactivos de PCR (por ejemplo, nucleótidos, ADN polimerasa AmpliTaq, el cebador y la muestra de ADN del bacteriófago lambda) en tubos y se transfirieron a la cámara de reacción mesoescalar en el sustrato de silicio. Las concentraciones finales de los reactivos fueron: nucleótidos, 200 mM de cada uno, polimerasa Taq, 0,25 U/10 ml; cebadores, 1,0 mM de cada, molde de ADN, 0,1 ng por 10 ml. La variación cíclica de temperatura (normalmente 35 ciclos) se realizó automáticamente usando un calentador-enfriador Peltier controlado por ordenador.

Los resultados de esta reacción por PCR usando diferentes procedimientos de pasivación de las paredes de la cámara de reacción mesoescalar fabricada en el sustrato de silicio se ilustran en la Figura 23. La Figura 23 es un dibujo de un gel de agarosa que contienen bromuro de etidio, después de la electroforesis de los productos de reacción en el gel. Las líneas en el gel corresponden como sigue: (1 y 7) marcadores de pesos moleculares (1.000, 750, 500, 300, 150 y 50 pb); (2) productos de una reacción de amplificación control realizada en un ciclador térmico Perkin-Elmer Modelo 9600; (3) productos de una reacción de amplificación control en una cámara de reacción no tratada; (4) productos de una reacción de amplificación en una cámara de reacción que tiene una película térmica de óxido de silicio en las superficies de las paredes, (5) productos de una reacción de amplificación en la cámara de reacción que tiene un revestimiento de nitruro de silicio en la superficie formado por un procedimiento deposición química en vapor mejorada por plasma (PECVD) usando una mezcla de silano y amoniaco; y (6) productos de una reacción de amplificación en una cámara de reacción que tiene un revestimiento superficial de una película de óxido de silicio formada por el procedimiento PECVD. Los procedimientos para la oxidación térmica del silicio se describen, por ejemplo, en Runyan y Bean, "Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology," Addison-Wesley Publishing Co., 1990, Capítulo 3. Los procedimientos para la deposición de películas en superficies por un procedimiento de deposición química por vapor ayudada por plasma se describen, por ejemplo, en Sze, "VLSI Technology," McGraw-Hill Book Co., 1983, Capítulo 3.

Como se ilustra en la Figura 23, el producto de reacción se incrementó sustancialmente en las cámaras de reacción provistas de un revestimiento térmico de óxido (calle 4) o un revestimiento de óxido PECVD (calle 6) en comparación con la cámara de reacción de silicio no tratada (calle 3). En contraste, el revestimiento de nitruro de silicio (calle 4) no tuvo un efecto de pasivación positivo en la reacción de amplificación.

55 Ejemplo 4

Se proporciona un revestimiento a una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos mesoescalar fabricada en un sustrato de silicio para pasivar las superficies de las paredes de la cámara.

Se proporciona un sustrato de silicio el cual se fabrica con unos puertos de entrada y salida de fluido y un sistema de flujo mesoescalar que incluye un canal de flujo, en comunicación fluida con los puertos, y una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos. La cámara de reacción de amplificación mesoescalar, que tiene unas dimensiones de 80 μ m de profundidad, 8 mm de anchura, y 14 mm de longitud,

se trata con un reactivo siliconizante y opcionalmente una macromolécula para formar un revestimiento el cual pasiva a la superficie de silicio. La cámara de amplificación se llena con un reactivo siliconizante tal como AquasilTM o SurfasilTM (Pierce, Rockford, IL) o SigmacoteTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) usando una pipeta de 100 μ l y aplicando una presión negativa al agujero de salida de la placa. El agente siliconizante se deja permanecer en la placa durante al menos 30 min. a temperatura ambiente. Una presión negativa constante se aplica al puerto de salida para retirar el reactivo siliconizante, durante al menos alrededor de cuatro horas. Se envían alrededor de 100 μ l de agua destilada o tampón TE 0,1 M a través del sistema de flujo por el puerto de entrada hasta la cámara de amplificación, usando una pipeta de 100 μ l, y se aplica una presión negativa al puerto de salida. Se repite el lavado alrededor de 6 veces. Después del último lavado, se aplica presión negativa al puerto de salida durante alrededor de 10 a 15 minutos para drenar los canales.

Alternativamente, la superficie de la cámara de amplificación se pasiva con un reactivo de silanización tal como el dimetildiclorosilano (DMDCS) o dimetilclorosilano (DMCS). Los procedimientos que se pueden usar para tratar superficies con agentes siliconizantes o silanizantes se describen, por ejemplo, en Pierce, "Instructions: Siliconizing Agents," Rockford, IL, 1993, la descripción del cual se incorpora aquí por alusión.

La cámara de reacción de amplificación después se llena opcionalmente con una solución de un agente de bloqueo que consta de una macromolécula (alrededor de 10 mg/ml de macromolécula en tampón Tris 0,1 M, pH 8,6), por ejemplo, un polímero de aminoácido (ver Tabla 2), por el puerto de entrada usando una pipeta de 100 μ l y aplicando una presión negativa al puerto de salida. La solución de macromolécula se deja permanecer en la cámara de reacción durante al menos alrededor de 1 hr a 4°C. Se aplica entonces una presión negativa al puerto de salida del dispositivo durante alrededor de 10 a 15 minutos. Esto proporciona un revestimiento de la macromolécula asociado no covalentemente con la superficie de silicio tratada.

Ejemplo 5

Se probó la efectividad de diferentes revestimientos en la disminución del efecto inhibitorio del silicio en una reacción de amplificación de polinucleótidos.

Se revistió una muestra de polvo de silicio con SurfasilTM (Pierce, Rockford, IL) o SigmacoteTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se dejó secar. Las partículas de silicio se revistieron entonces con una variedad de macromoléculas diferentes (obtenidas de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) listadas en la Tabla 2, como se describió en el Ejemplo 4. Se pusieron entonces alrededor de 4 mg de cada preparación de silicio revestido en tubos de reacción separados conteniendo 45 μ l de una mezcla de reacción para PCR (ver Ejemplo 3) y se ejecutaron en un ciclador térmico Perkin Elmer Modelo 9600.

Adicionalmente, se le proporciono un revestimiento de un reactivo de silanización o un reactivo siliconizante asociado con diferentes macromoléculas (Tabla 2) a una cámara de reacción mesoescalar teniendo unas dimensiones de 80 μ m de profundidad, 8 mm de anchura, y 14 mm de longitud, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Se llevó a cabo una reacción por PCR en las cámaras de reacción revestidas usando los reactivos como se describió en el Ejemplo 3. Los resultados usando diferentes revestimientos se muestran en la Tabla 2, usando una escala de valoración de 0 a 4, donde el control positivo (ejecutado en el GeneAmp 9600) tiene una valoración de 3. Como se ilustra en la Tabla 2, el revestimiento más efectivo fue SurfasilTM (Pierce, Rockford, IL) en combinación con polivinilpirrolidona o ácido poliadenílico.

TABLA 2

	No. Agente de silicona /macromolécula	Valoración de Efectividad en el Polvo de Silicio	Valoración de Efectividad en la placa de PCR
5			
10	1. Sigmacote TM /Poli-L-alanina	2	-
	2. Sigmacote TM /Poli-L-ácido aspártico	0	-
	3. Sigmacote TM /Poliglicina	3	>1
	4. Sigmacote TM /Poli-L-leucina	3	0
15	5. Sigmacote TM /Poli-L-fenilalanina	2	-
	6. Sigmacote TM /Poli-L-triptófano	2	-
	7. Sigmacote TM /Poli-L-lisina	0	-
	8. Sigmacote TM /Polivinilpirrolidona	>1	-
20	9. Sigmacote TM /Ácido poliadenílico	4	0
	10. Sigmacote TM /Polimaleimida	0	-
	11. Sigmacote TM /Maleimida	1	-
25	12. Surfasil TM /Poli-a-alanina	3	2
	13. Surfasil TM /Poli-L-ácido aspártico	0	-
	14. Surfasil TM /Poliglicina	1	-
	15. Surfasil TM /Poli-L-leucina	2	-
30	16. Surfasil TM /Poli-L-fenilalanina	2	-
	17. Surfasil TM /Poli-L-triptófano	1	-
	18. Surfasil TM /Poli-L-lisina	0	-
	19. Surfasil TM /Polivinilpirrolidona	4	2 a 3
35	20. Surfasil TM /Ácido poliadenílico	4	3 a 4
	21. Surfasil TM /Polimaleimida	0	-
	22. Surfasil TM /Maleimida	1	-
	23. Silicio no revestido	0	0 a 2
40	24. Surfasil TM	3	0 a 1
	25. Sigmacote TM	2	-
	26. DMDCS	-	0
	27. DMCDs/ácido poliadenílico	-	1
45	28. AquaSil TM en H ₂ O 1:99	-	1

Se entenderá que las descripciones anteriores se hacen a título de ilustración, y que la invención puede tomar otras formas dentro de las estructuras y procedimientos descritos aquí. A los expertos en la materia les pueden ocurrir variaciones y modificaciones, y todas tales variaciones y modificaciones se consideran parte de la invención, como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (10) para amplificar un polinucleótido en una muestra llevando a cabo una reacción de amplificación de polinucleótidos, constando el dispositivo (10) de:

Un sustrato sólido (14) fabricado para incluir al menos una cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos (22), teniendo dicha cámara al menos una dimensión transversal mesoescalar entre 0,1 y 1.000 μm , constando dicha cámara de reacción (22) de al menos un reactivo para la amplificación in vitro de dicho polinucleótido y constando de al menos una pared que tenga asociado consigo un material el cual disminuya la inhibición por dicha pared de una reacción de polinucleótido en dicha cámara; y

al menos un puerto (16) en comunicación fluida con dicha cámara de reacción (22) para introducir dicha muestra en dicha cámara de reacción (22).

2. El dispositivo (10) de la reivindicación 1, el cual consta además de un canal de flujo (20) conectando dicho puerto (16) con dicha cámara de reacción (22).

3. El dispositivo (10) de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho sustrato sólido (14) consta de un material seleccionado del grupo que consta de vidrio, silicio, sílice, polisilicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, plástico o material polimérico orgánico.

4. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cámara de reacción (22) tiene una profundidad menor que 500 μm .

5. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cámara de reacción (22) tiene una profundidad menor que 300 μm .

6. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cámara de reacción (22) tiene una profundidad menor que 80 μm .

7. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha cámara de reacción tiene una relación entre el área superficial y el volumen mayor que 3 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$.

8. El dispositivo (10) de la reivindicación 7, en donde dicha relación es mayor que 5 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$.

9. El dispositivo (10) de la reivindicación 7, en donde dicha relación es mayor que 10 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$.

10. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho material se adhiere a la superficie de dicha pared.

11. El dispositivo (10) de la reivindicación 10, en donde dicho material se une covalentemente a dicha superficie de la pared.

12. El dispositivo (10) de la reivindicación 10, en donde dicho material consta de un polímero.

13. El dispositivo (10) de la reivindicación 12, en donde dicho material consta de un poli(cloruro de vinilo)

14. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho material consta de un agente de bloqueo en una disolución dispuesta dentro de dicha cámara de reacción.

15. El dispositivo (10) de la reivindicación 14, en donde dicho agente de bloqueo se selecciona del grupo consistente en polinucleótidos y polipéptidos.

16. El dispositivo (10) de la reivindicación 15, en donde dicho agente de bloqueo es un polinucleótido de bloqueo seleccionado del grupo consistente en ADN, ARN, ácido poliguanílico y ácido poliadenílico.

17. El dispositivo (10) de la reivindicación 16, en donde dicha disolución que consta de dicho polinucleótido de bloqueo también consta de un polinucleótido de muestra a amplificar en dicha cámara de reacción.

18. El dispositivo (10) de la reivindicación 10, en donde dicha composición consta de un revestimiento de silano en dicha superficie de la pared.

19. El dispositivo (10) de la reivindicación 18, en donde dicho revestimiento se forma por reacción de dicha superficie de pared con un silano seleccionado del grupo que consta de dimetilclorosilano, dimetildiclorosilano, hexametildisilazano y trimetilclorosilano.

5 20. El dispositivo (10) de la reivindicación 10, en donde dicho material consta de un revestimiento de silicona en dicha superficie de pared.

21. El dispositivo (10) de la reivindicación 20, en donde dicho revestimiento se forma mediante la interacción de dicha superficie de pared con un reactivo siliconizante.

10 22. El dispositivo (10) de la reivindicación 20, constando además de una macromolécula asociada con dicho revestimiento de silicona.

15 23. El dispositivo (10) de la reivindicación 22, donde dicha macromolécula es un polímero de aminoácido.

24. El dispositivo (10) de la reivindicación 22, donde dicha macromolécula se selecciona del grupo consistente en polivinilpirrolidona, ácido poliadenílico y polimaleimida.

20 25. El dispositivo (10) de la reivindicación 10, en donde dicho material consta de una película de óxido de silicio dispuesta en dicha superficie de pared.

26. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, el cual consta además de un regulador térmico (57) para regular la temperatura dentro de dicha cámara de reacción.

25 27. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, el cual consta además de un sistema de detección para detectar un producto de dicha reacción de amplificación de polinucleótidos.

28. El dispositivo (10) de la reivindicación 27, en donde dicho sistema de detección consta de:

30 Un agente formador de complejos el cual, en contacto con dicho producto de dicha reacción de amplificación de polinucleótidos, forma un complejo detectable con dicho producto;

35 Una cámara (26) en la que dicho producto de reacción de amplificación de polinucleótidos contacta con dicho agente formador de complejos, formando por tanto dicho complejo detectable; y

Un detector para determinar la presencia o cantidad de dicho complejo detectable en dicha cámara.

40 29. El dispositivo (10) de la reivindicación 28, en donde dicha cámara (26) en la cual se forma dicho complejo detectable es la cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos (22).

30. El dispositivo (10) de la reivindicación 28 ó 29, en donde dicha cámara (26) en la cual se forma dicho complejo detectable es una cámara de detección en comunicación fluida con dicha cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos (22).

45 31. El dispositivo (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde dicha cámara de reacción (22) está cubierta al menos parcialmente por una cubierta (12) dispuesta sobre el sustrato.

50 32. El dispositivo (10) de la reivindicación 2 o de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 31 adjuntas a la reivindicación 2, en donde dicho puerto (16) y dicho canal de flujo (20) están fabricados sobre dicho sustrato (14).

55 33. El dispositivo (10) de la reivindicación 2 o de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 31 adjuntas a la reivindicación 2, constando además de una cubierta (12) dispuesta sobre dicho sustrato (14), en donde dicho puerto (16) y dicho canal de flujo (20) están fabricados en dicha cubierta (12).

34. El dispositivo (10) de las reivindicaciones 31 ó 33, en donde dicha cubierta (12) consta de un material seleccionado del grupo consistente en vidrios y materiales poliméricos orgánicos.

60 35. El dispositivo (10) de la reivindicación 32, constando además de un miembro (85) que se extiende desde dicho sustrato (14), y capaz de sellar dicho puerto (16) por depresión de dicho miembro (85) contra dicho puerto (16).

36. Un dispositivo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, constando además el dispositivo de:

Un sistema de introducción de muestras para introducir una muestra en dicho dispositivo, el cual
5 también consta de un respiradero (16B);

Al menos un canal de flujo de muestra extendiéndose desde dicho puerto (16);

La cámara de reacción de amplificación de polinucleótidos (22) que está en comunicación fluida con
10 dicho canal de flujo (20) y dicho respiradero (16B); y

Un aparato de liberación de fluido para enviar fluido hasta y recibir fluido desde dicho puerto de entrada (16), en donde dicho aparato de liberación de fluido se ajusta a dicho puerto de entrada (16) y sella reversiblemente dicho puerto de entrada.

15 37. El dispositivo (10) de la reivindicación 36, en donde dicho aparato de liberación consta de una jeringa.

38. El dispositivo (10) de la reivindicación 36, en donde dicho aparato de liberación consta de una
20 pipeta, constando dicha pipeta de una punta de pipeta (84) provista de una apertura (88) para transferir fluido entre dicha punta de pipeta (84) y dicho puerto de entrada (16).

39. Un dispositivo (10) para llevar a cabo una reacción de amplificación de polinucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, constando además el dispositivo de:

25 Una cubierta (12) dispuesta sobre dicho sustrato (14), estando fabricada al menos una de dichas cámaras de reacción de amplificación de polinucleótidos (22) en al menos uno de dicho sustrato (14) ó dicha cubierta (12), y en donde dicha cubierta (12) consta de:

Una cavidad (87) para recibir y ajustarse a con una pipeta que consta de una punta de pipeta (84)
30 provista de una apertura (88); y

Un canal de flujo (20) que comunica entre dicha apertura (88) de dicha punta de pipeta (84) y dicha cámara de reacción (22), cuando dicha pipeta está encajada dentro de dicha cavidad (87).

35 40. El dispositivo (10) de la reivindicación 39, en donde dicha cubierta (12) consta de un material transparente.

41. El dispositivo (10) de la reivindicación 40, en donde dicho material transparente consta de un material seleccionado del grupo consistente en vidrios y materiales poliméricos orgánicos.
40

42. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 39 a 41, en donde dicha apertura (88) está posicionada en una pared de dicha punta de pipeta (84) para permitir a dicha punta de pipeta (84) moverse, cuando dicha pipeta está encajada en dicha cavidad (87), entre:

45 Una primera posición la cual permite la transferencia de fluido desde dicha punta (84) a través de dicha apertura (88) y dicho canal (29) hasta dicha cámara de reacción (22); y

Una segunda posición la cual permite a dicha apertura (88) mirar hacia una pared de dicha cavidad (87), sellando de ese modo dicho canal (20) y dicha cámara (22).
50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la
55 aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

60 Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

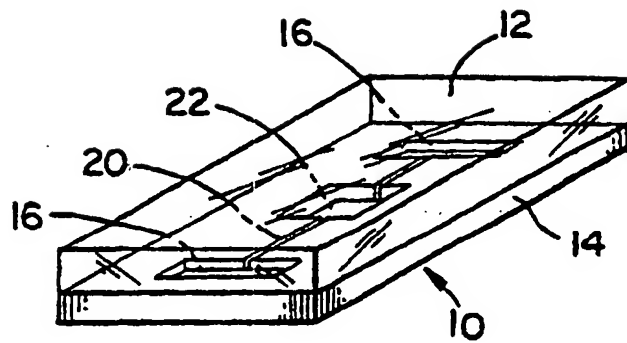
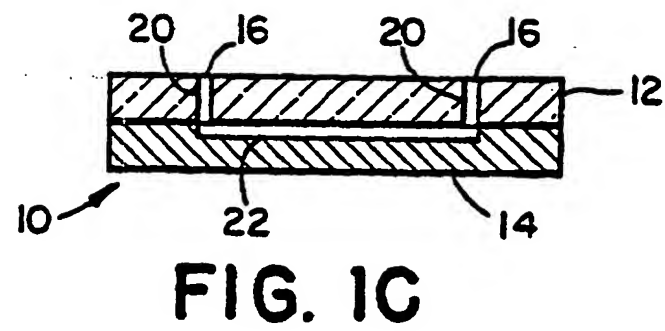
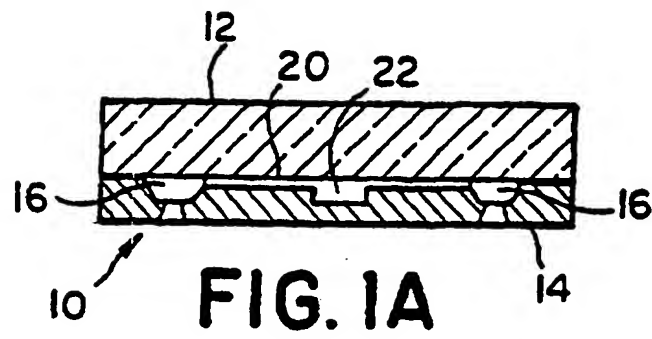


FIG. 2A

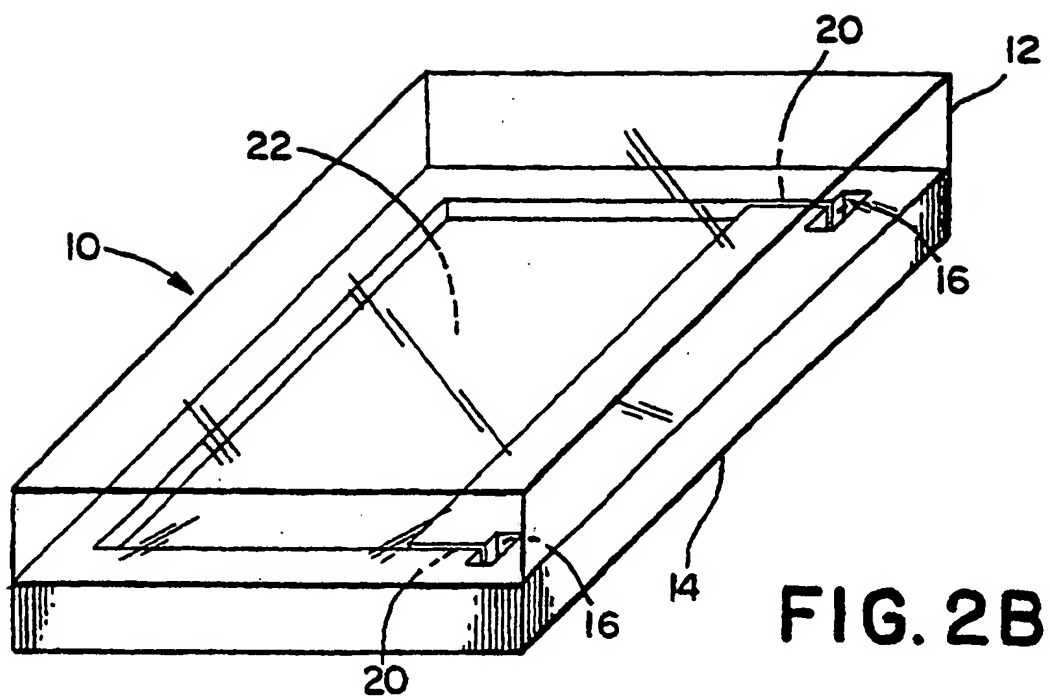
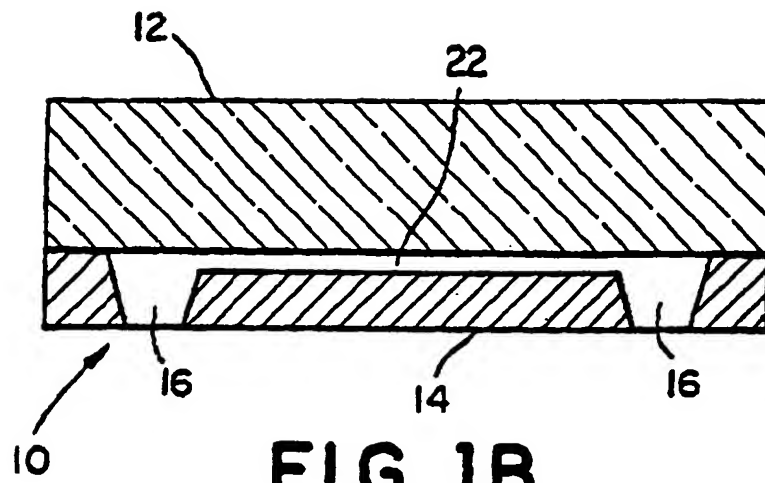


FIG. 3A

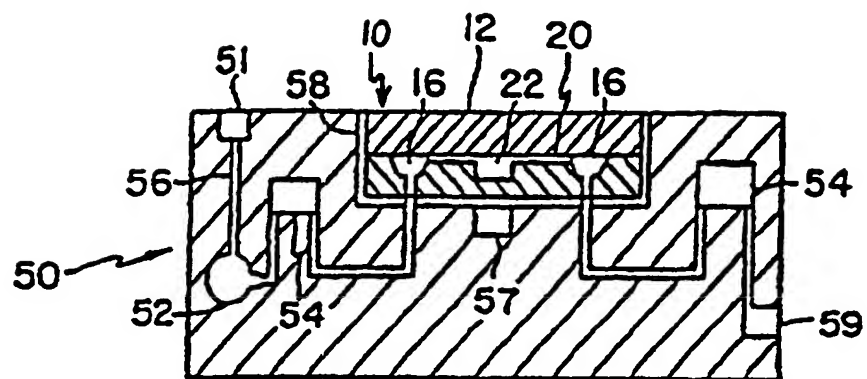


FIG. 3B

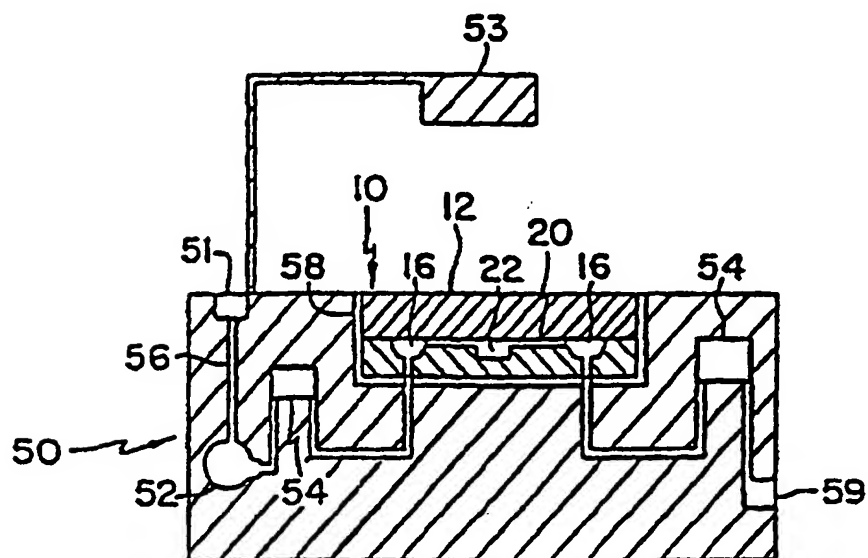


FIG.4

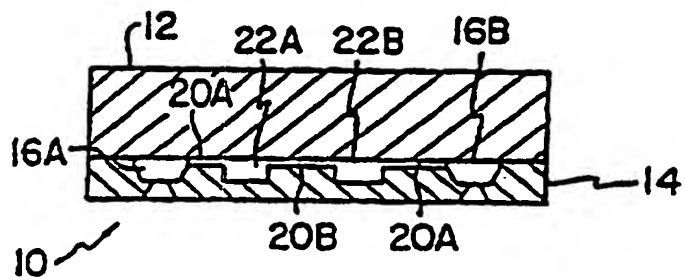


FIG.5

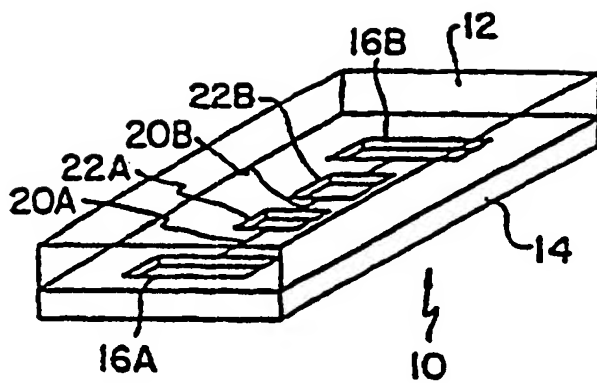


FIG. 6A

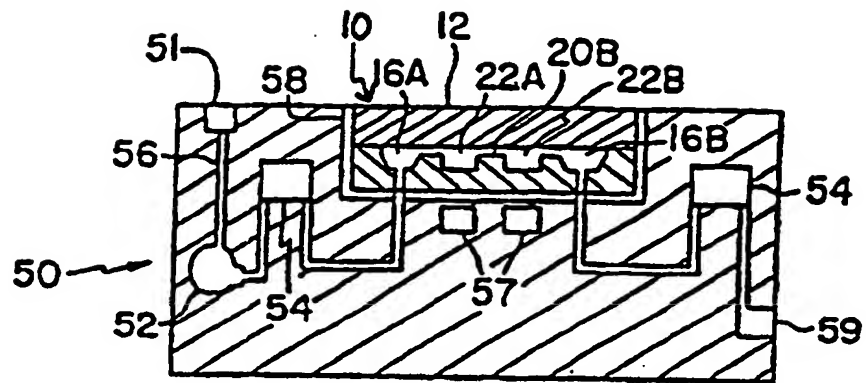


FIG. 6B

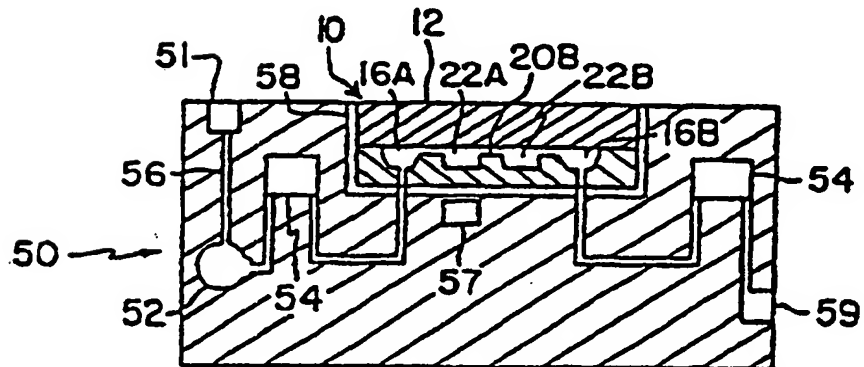


FIG. 7

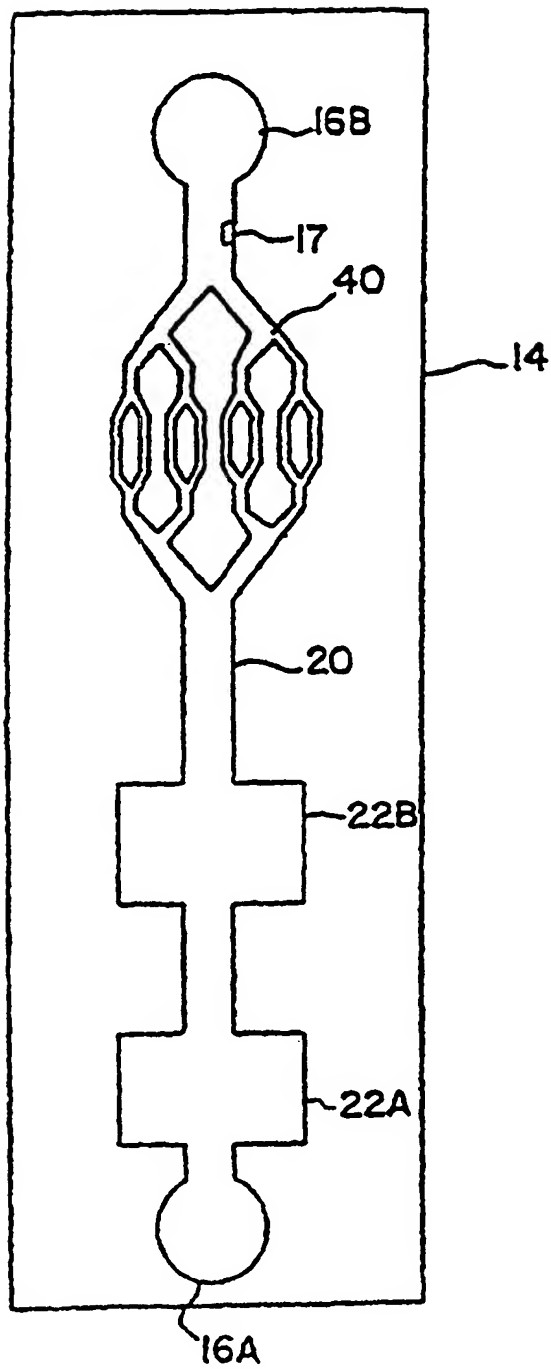


FIG. 8

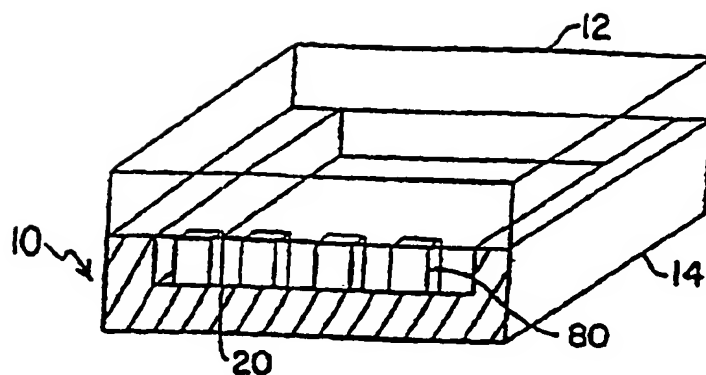


FIG. 9

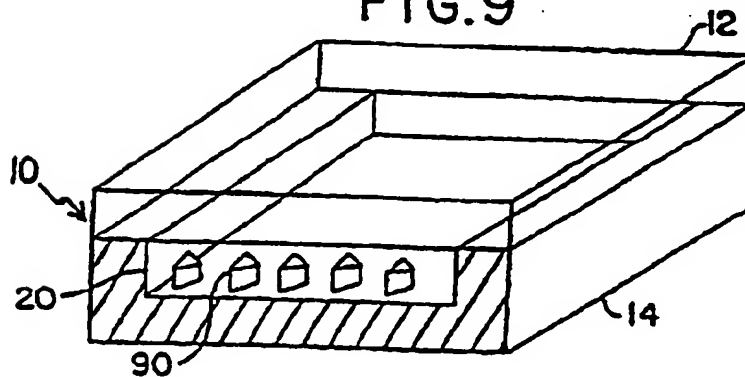


FIG. 12

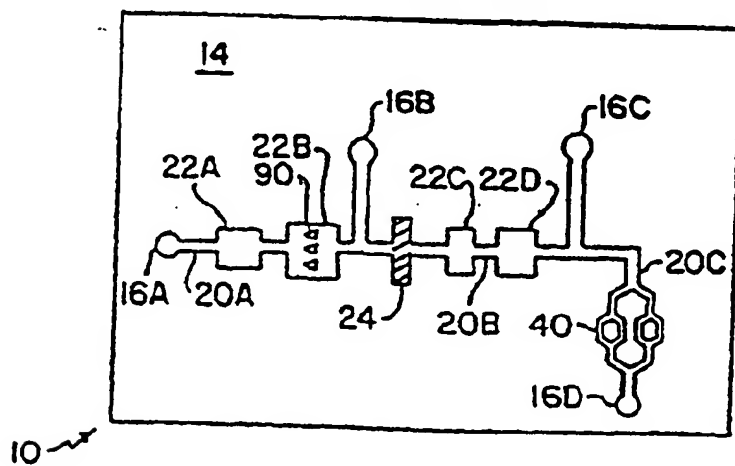


FIG. 10A

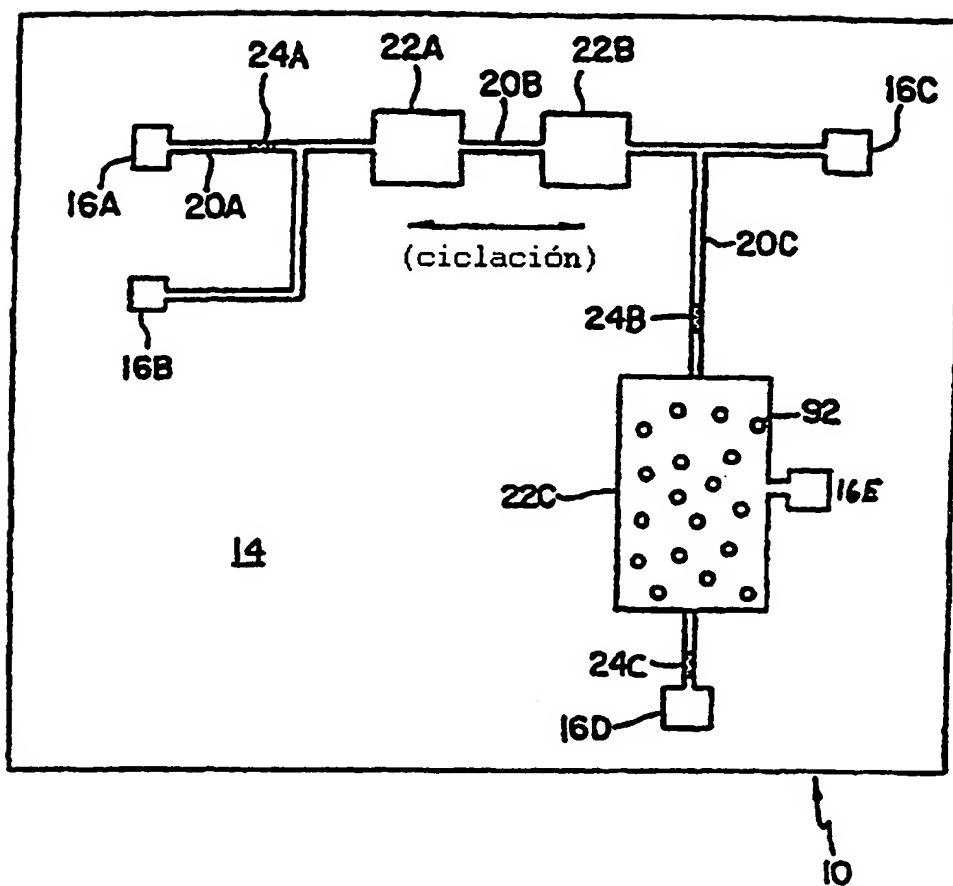


FIG.10B

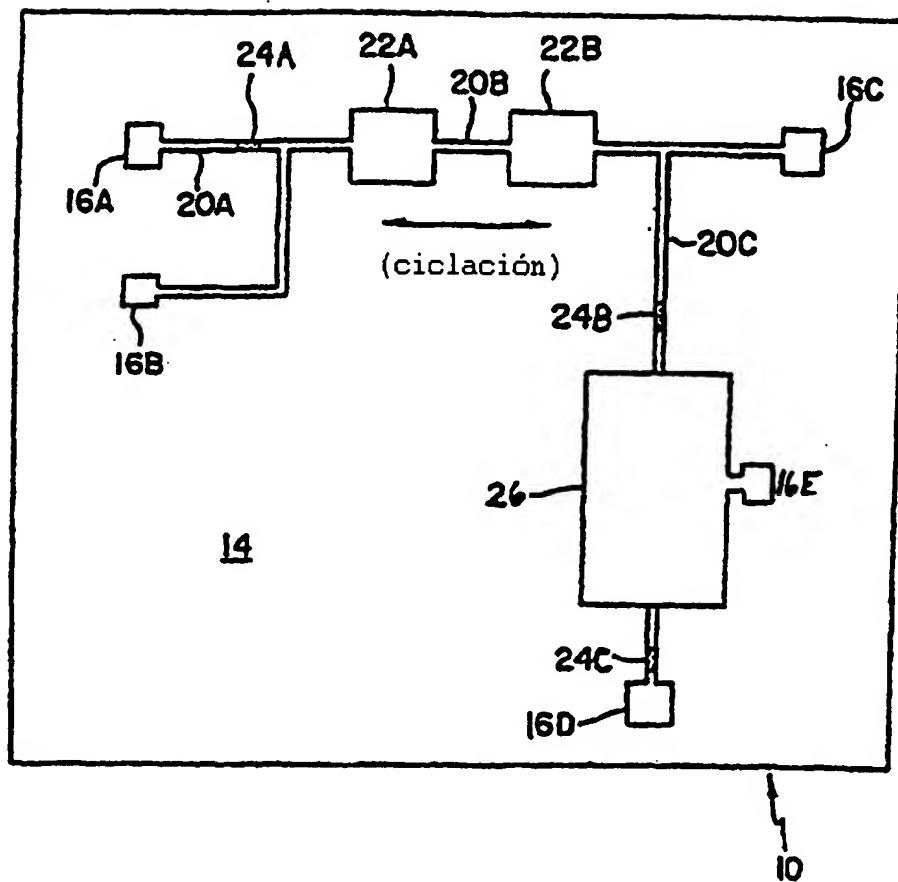


FIG. II

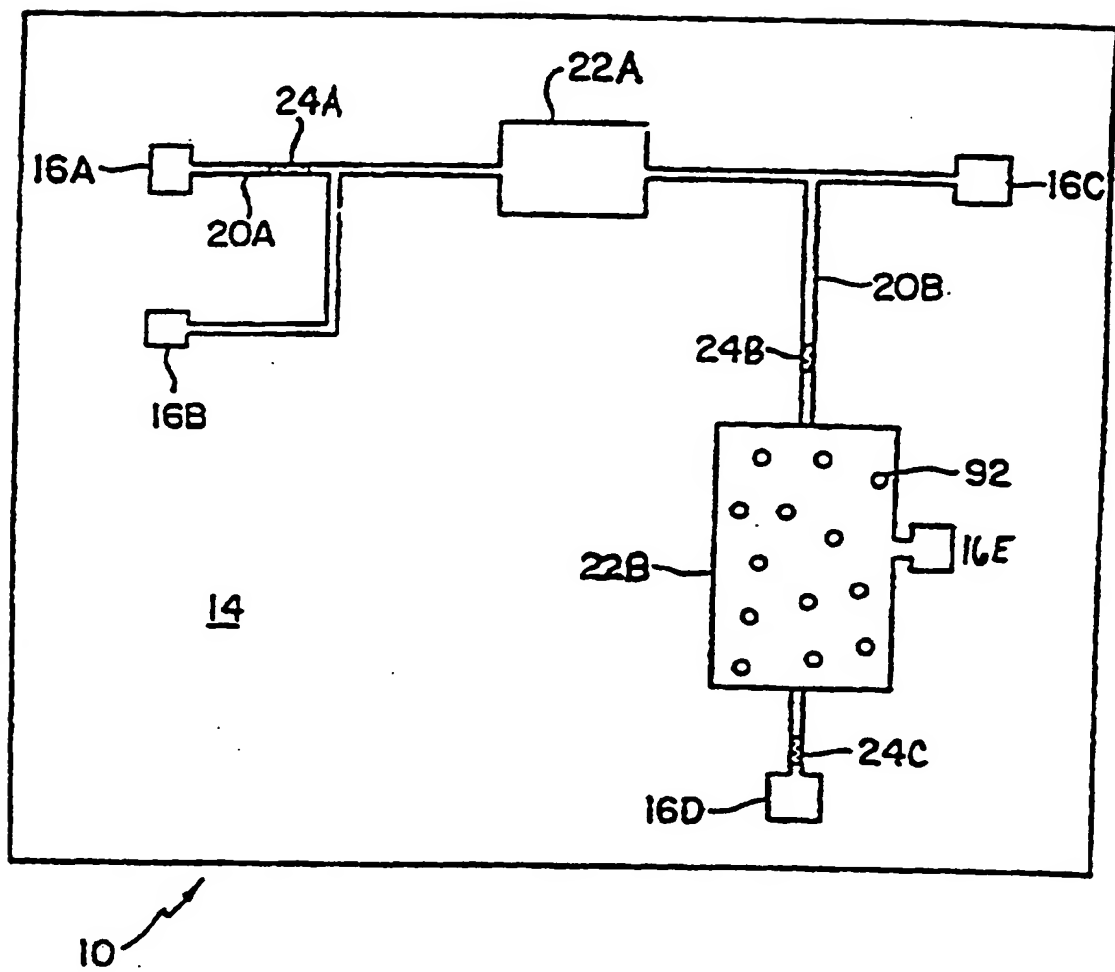


FIG. 13

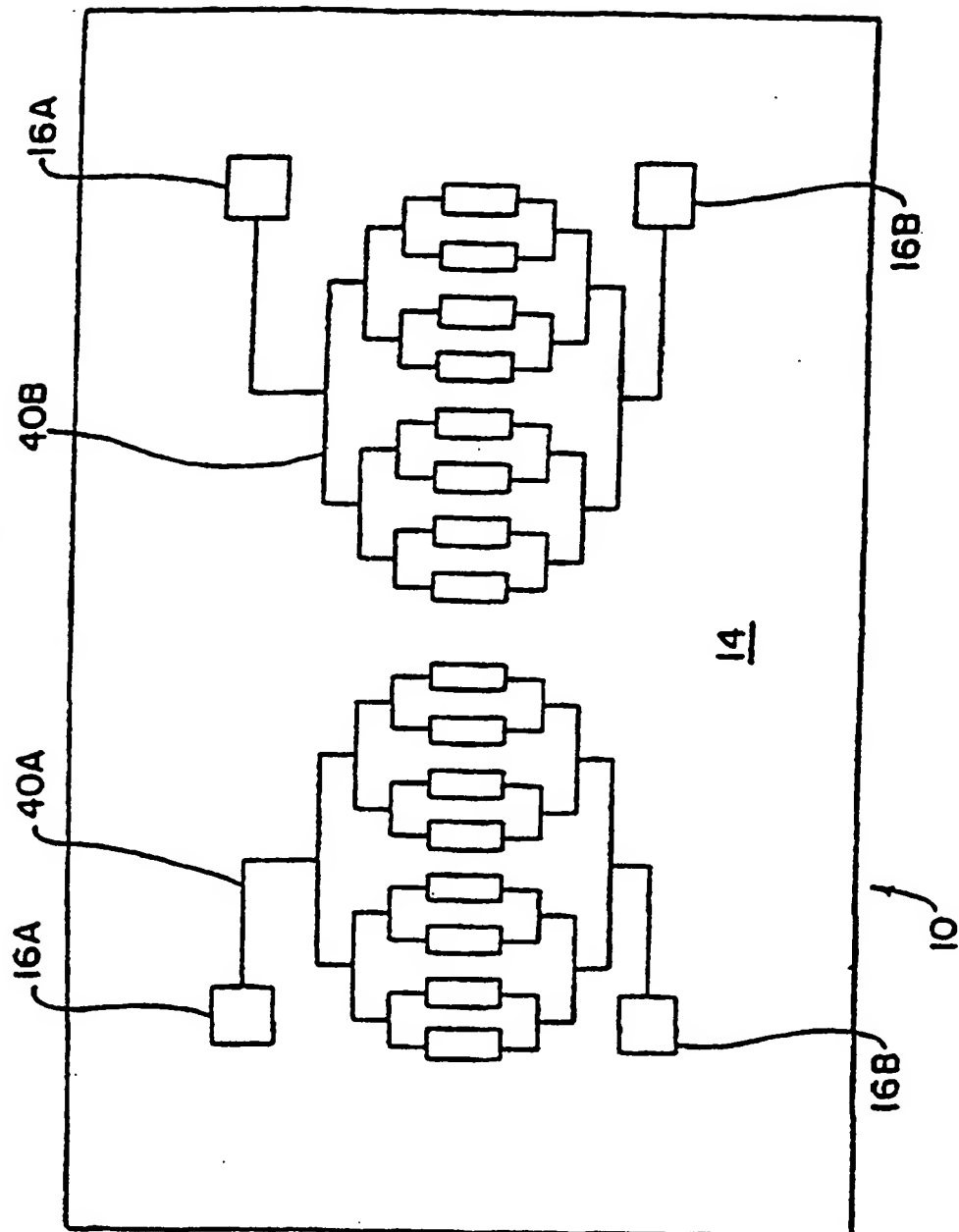


FIG. 14

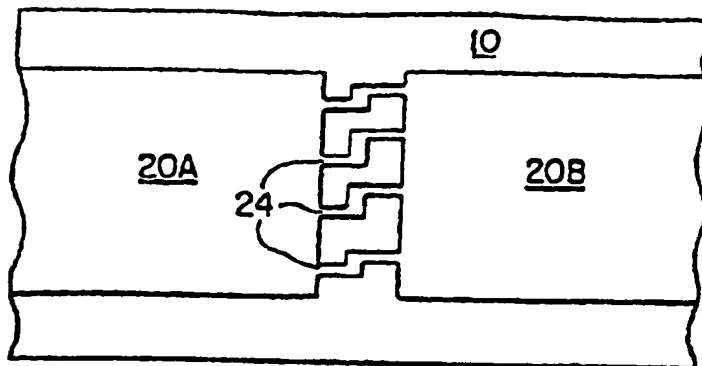


FIG. 15

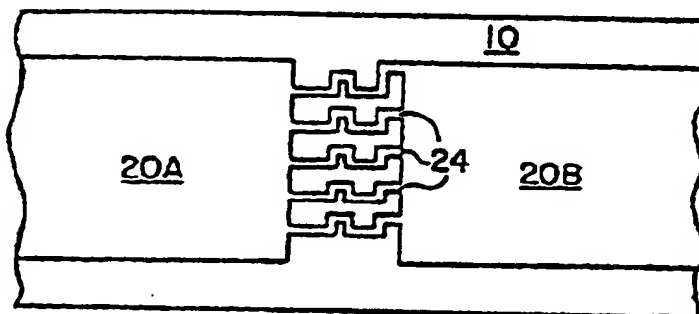


FIG. 16

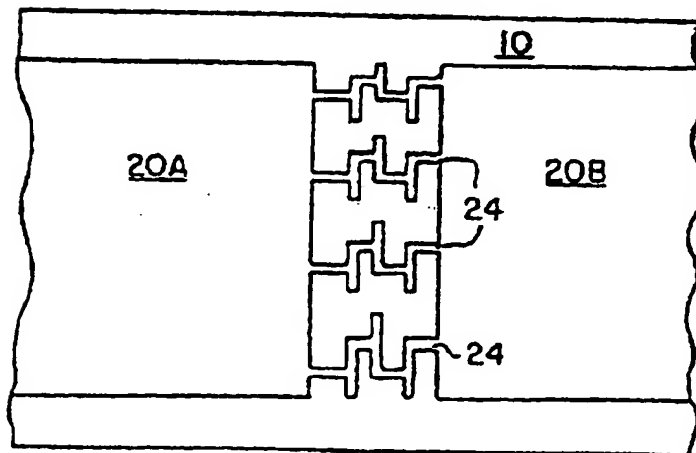


FIG.18

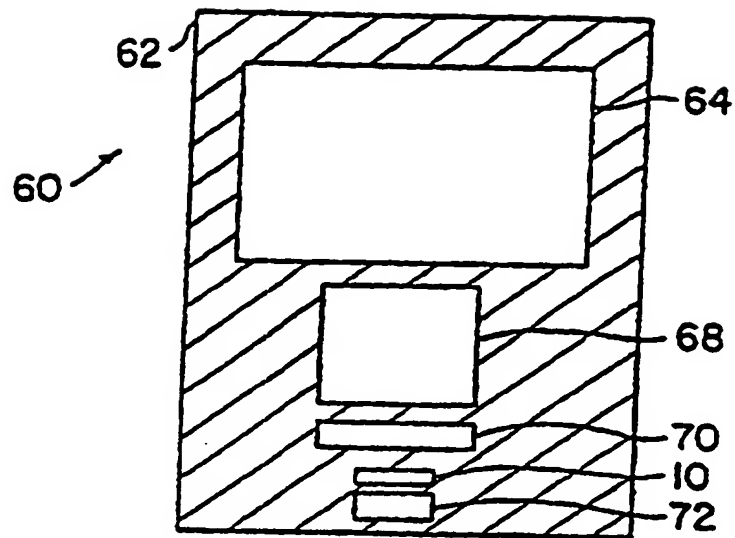
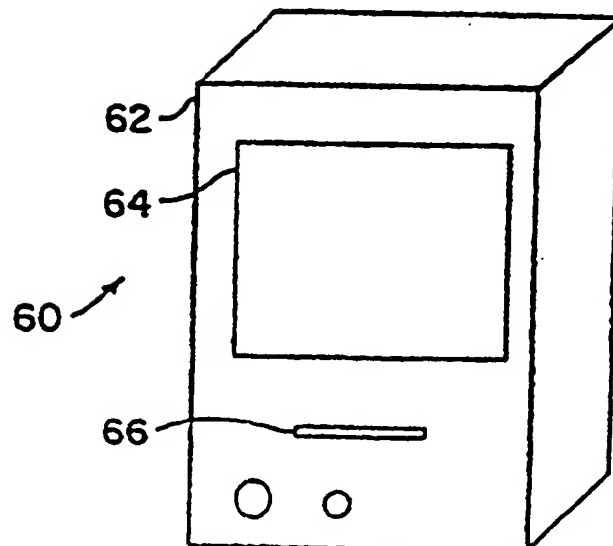


FIG.17



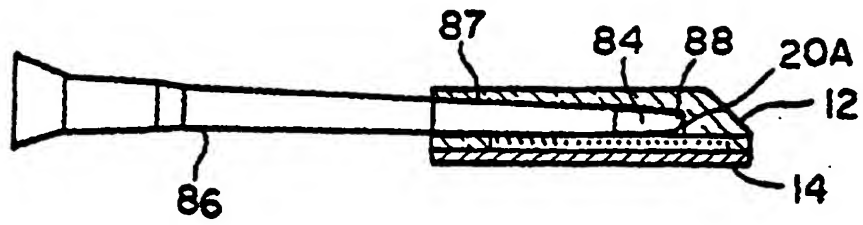


FIG. 19

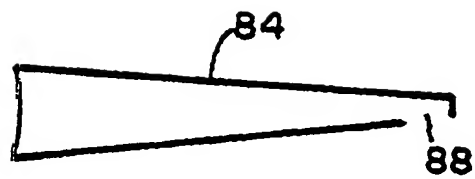


FIG. 20

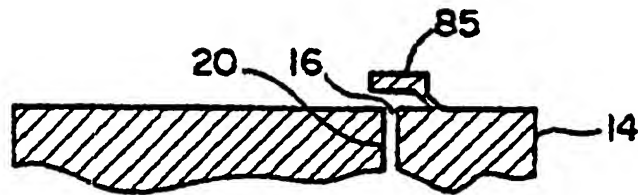


FIG. 21

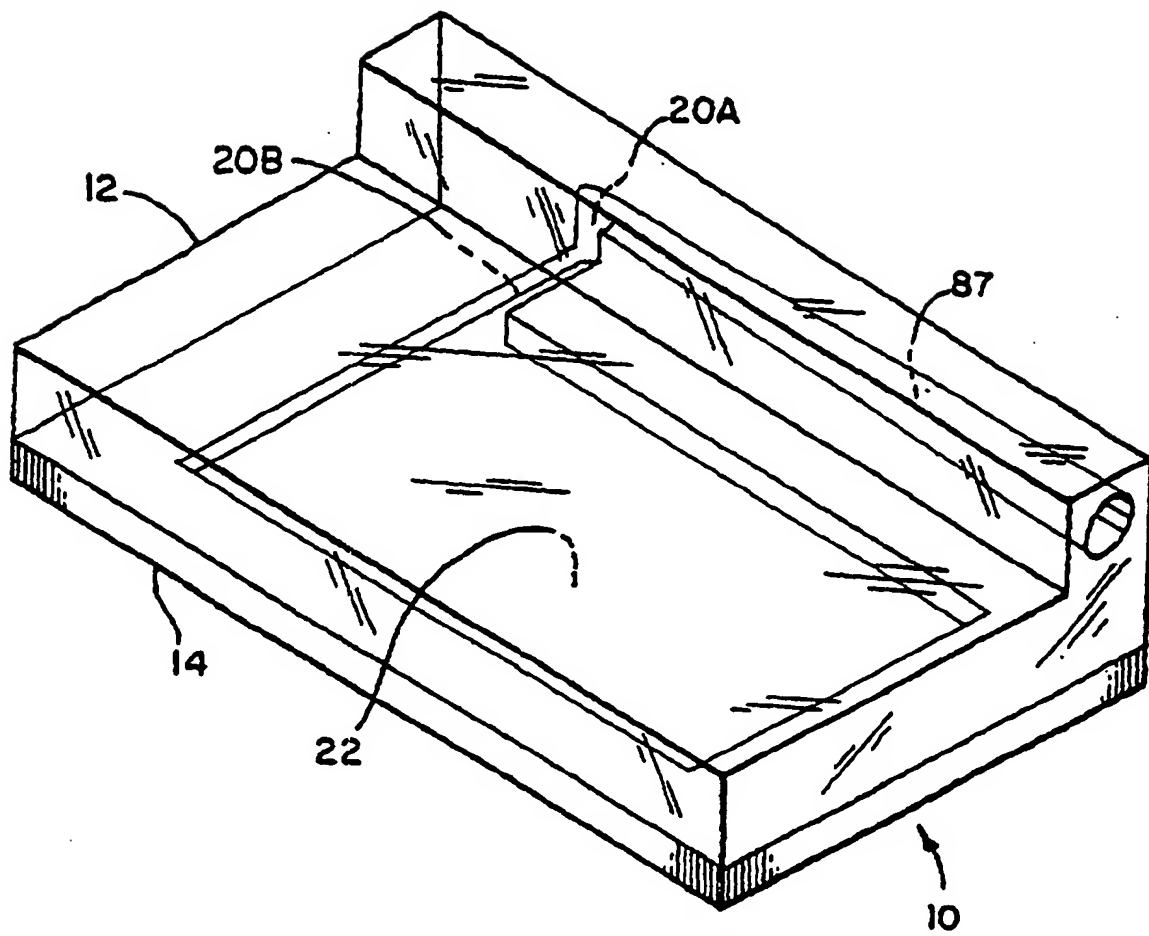


FIG. 22

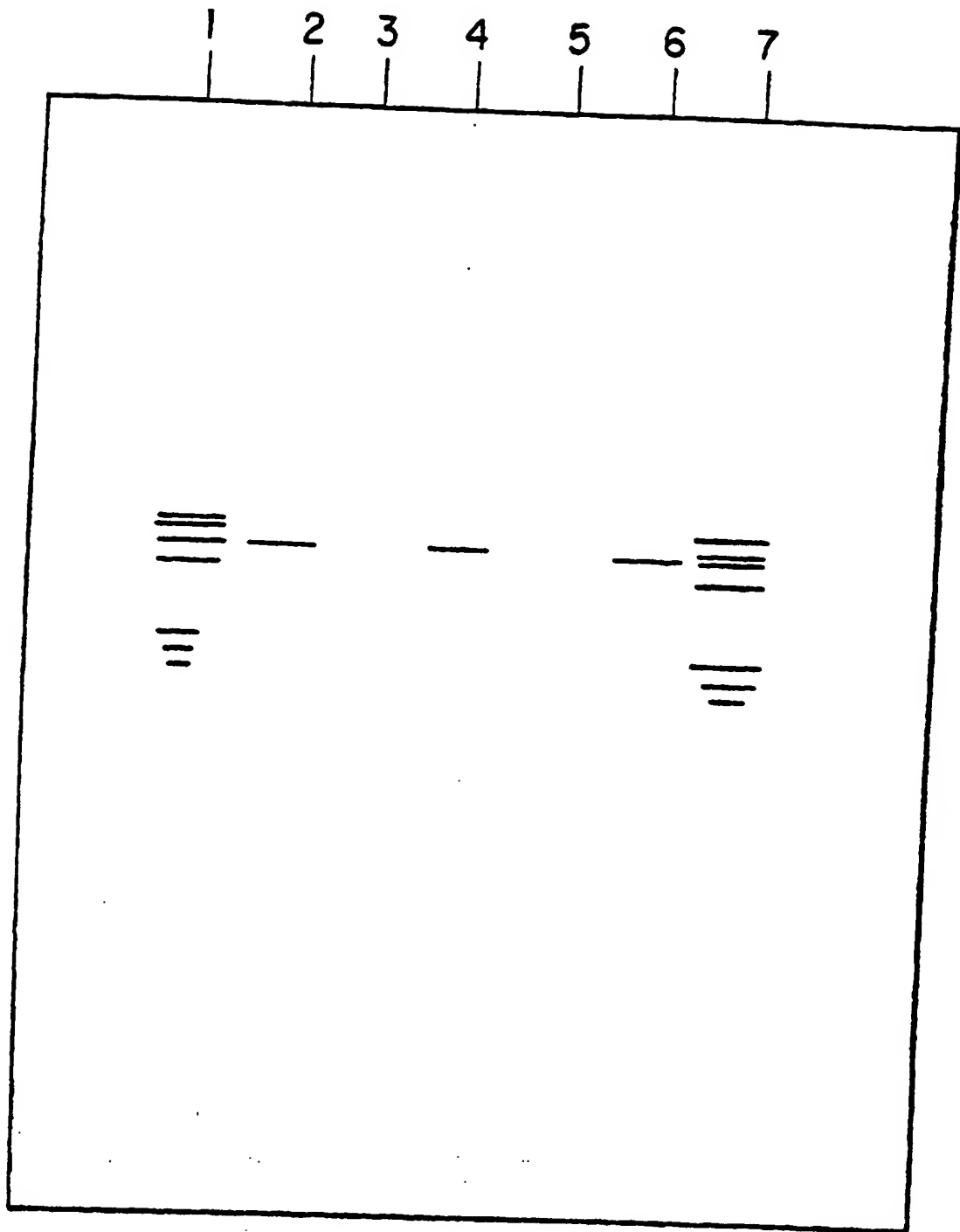


FIG. 23